排出ガス、ばいじん及び燃え殻の
ダイオキシン類簡易測定法マニュアル
（生物検定法）

平成２２年３月

環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室

マニュアルの改訂にあたって

排出ガスやばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類の測定については、極微量の測定となるため、これまで高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた測定方法により行われてきたが、この方法では多大な時間と費用が必要となり、特定施設設置者などにとって大きな負担となってきた。

このような負担を軽減し、ダイオキシン類の長期的管理の基盤となる測定やモニタリングが効果的かつ効率的に行われるようにするため、環境省では迅速で低廉な、いわゆる簡易測定法の導入を検討し、平成 16 年 12 月にダイオキシン類対策特別措置法施行規則（平成 11 年総理府令第 67 号）の一部を改正して、廃棄物焼却炉からの排出ガス（焼却能力 2,000kg/h 未満）やばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類の測定の一部に簡易測定法を追加するとともに、平成 17 年 9 月にダイオキシン類対策特別措置法施行規則第二条第一項第四号の規定に基づき環境大臣が定める方法（平成 17 年環境省告示第 92 号。以下「方法告示」という。）を定め、４種類の生物検定法を指定した。

その後の科学的な知見の蓄積などを踏まえ、平成 22 年 3 月に方法告示の一部を改正し、新たに 6 種類の生物検定法を追加した。今般、この改正を受けて、本マニュアルを改訂し、当該測定方法を追加するとともに、マニュアルに記載されている事項の見直しを行った。

本マニュアルが、ダイオキシン類の測定やモニタリングのより効果的かつ効率的な実施に寄与し、ダイオキシン類の削減に役立つことを期待する。

平成 22 年 3 月 31 日

環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室

（マニュアル制定・改正履歴）
平成 17 年 9 月 14 日制定
平成 18 年 3 月 23 日改訂
平成 20 年 3 月 17 日改訂
平成 22 年 3 月 31 日改訂

ダイオキシン類生物検定法等簡易測定法検討会委員名簿（～平成 17 年度）

（敬称略、五十音順）

	伊藤　裕康	独立行政法人国立環境研究所 化学環境研究領域 計測管理研究室
	小森　行也	独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ
	酒井　伸一	京都大学 環境保全センター
	滝上　英孝	独立行政法人国立環境研究所 循環型社会形成推進・廃棄物研究センター 有害廃棄物管理研究室
	半野　勝正	千葉県 環境研究センター 廃棄物・化学物質部 化学物質研究室
	細見　正明	東京農工大学大学院 共生科学技術研究部
	宮田　秀明	摂南大学 薬学部
○	森田　昌敏	独立行政法人国立環境研究所
	渡邉　　肇	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

ダイオキシン類生物検定法等簡易測定法検討会委員名簿（平成 19 年度～平成 21 年度）

（敬称略、五十音順）

	伊藤　裕康	独立行政法人国立環境研究所 化学環境研究領域 有機環境計測研究室
	太田　壮一	摂南大学 薬学部 衛生薬学科
	鈴木　規之	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 曝露評価研究室
	滝上　英孝	独立行政法人国立環境研究所 循環型社会・廃棄物研究センター 物質管理研究室
	鑪迫　典久	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境曝露計測研究室（平成 20 年度～）
	半野　勝正	千葉県 環境研究センター 廃棄物・化学物質部 化学物質研究室
○	森田　昌敏	国立大学法人愛媛大学 農学部生物資源学科、独立行政法人国立環境研究所

（生物検定法検討作業部会／分科会）

○	鈴木　規之	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 曝露評価研究室
	鑪迫　典久	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境曝露計測研究室
	滝上　英孝	独立行政法人国立環境研究所 循環型社会・廃棄物研究センター 物質管理研究室
	半野　勝正	千葉県 環境研究センター 廃棄物・化学物質部 化学物質研究室
	中村　朋之	宮城県 保健環境センター 環境化学部（平成 19 年度）

○：座長

目　次

第１章　概論 1

第１節　対象物質........ 1
第２節　引用規格........ 1
第３節　用語の定義........ 1
第４節　測定方法の概要........ 3

第２章　各論（生物検定法に共通する事項） 6

第１節　試料採取方法 6
第２節　測定結果の報告 10
第３節　測定データの精度管理 14

第３章　各論(ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体に結合することを利用した方法)........ 29
その１　前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 1)........ 29
第１節 測定方法の概要 29
第２節 用語の定義 29
第３節 試料採取方法に関する特記事項 30
第４節 試料の前処理 32
第５節 測定 39
第６節 参考資料 56

その２　前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 2) 57
第１節 測定方法の概要 57
第２節 用語の定義 57
第３節 試料採取方法に関する特記事項 58
第４節 試料の前処理 59
第５節 測定 65
第６節 参考資料 75

その３　前処理に、多層カラムを使用し、測定にダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 3) 76
第１節 測定方法の概要 76
第２節 用語の定義 76
第３節 試料採取方法に関する特記事項 76
第４節 試料の前処理 78
第５節 測定 85
第６節 参考資料 95

その４　前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流法を利用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4ⅡE-luc を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 4) 96

第１節 測定方法の概要 96
第２節 用語の定義 96
第３節 試料採取方法に関する特記事項 97
第４節 試料の前処理 99
第５節 測定 104
第６節 参考資料 113

その５　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR-EcoScreen を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 5)........ 114
第１節 測定方法の概要 114
第２節 用語の定義 114
第３節 試料採取方法に関する特記事項 115
第４節 試料の前処理 117
第５節 測定 124
第６節 参考資料 135

その６　前処理に、硫酸及び多層シリカゲルカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類、アリール炭化水素受容体及びアリール炭化水素受容体核運搬タンパク質の複合体形成反応を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 6)........ 137
第１節 測定方法の概要 137
第２節 用語の定義 137
第３節 試料採取方法に関する特記事項 138
第４節 試料の前処理 140
第５節 測定 148
第６節 参考資料 159

第４章　各論(ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法) 160
その１　前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 1)........ 160
第１節 測定方法の概要 160
第２節 用語の定義 160
第３節 試料採取方法に関する特記事項 161
第４節 試料の前処理 162
第５節 測定 168
第６節 参考資料 180

その２　前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び酵素標識抗原を用いた直接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 2) 181
第１節 測定方法の概要 181
第２節 用語の定義 181
第３節 試料採取方法に関する特記事項 182
第４節 試料の前処理 184
第５節 測定 190
第６節 参考資料 202

その３　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 3)........ 203

第１節 測定方法の概要 203
第２節 用語の定義 203
第３節 試料採取方法に関する特記事項 204
第４節 試料の前処理 206
第５節 測定 213
第６節 参考資料 225

その４　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 4) 227
第１節 測定方法の概要 227
第２節 用語の定義 227
第３節 試料採取方法に関する特記事項 228
第４節 試料の前処理 231
第５節 測定 238
第６節 参考資料 252

第１章　概論

本マニュアルに記載する各測定方法は、廃棄物焼却炉のうち焼却能力が 1 時間当たり 2,000 キログラム未満の施設において当該施設設置者が排出ガスに含まれるダイオキシン類の量を測定する場合並びに廃棄物焼却炉において当該施設設置者がばいじん及び焼却灰その他の燃え殻（以下「ばいじん及び燃え殻」という。）に含まれるダイオキシン類の量を測定する場合に用いることができるものであり、罰則の適用に係る測定に用いることはできないものである。なお、今後、測定技術の進歩や科学的知見の集積等により、必要に応じ本マニュアルの改訂があり得るものである。

第１節　対象物質

本マニュアルに記載する各測定方法では、毒性等価係数を有するダイオキシン類(ポリ塩化ジベンゾフラン、ポリ塩化ジベンゾ―パラ―ジオキシン及びコプラナーポリ塩化ビフェニル)を測定対象とし、各測定法による実測濃度に所定の係数を乗じて測定量(毒性等量)を算出する。

第２節　引用規格

次に掲げる規格は、本マニュアルに引用されることによって、各測定方法の一部を構成する。これらの引用規格は、その最新版(追補を含む)を適用する。

JIS K0095　排ガス試料採取方法
JIS K0211　化学分析用語(基礎部門)
JIS K0215　化学分析用語(分析機器部門)
JIS K0301　排ガス中の酸素分析方法
JIS K0311　排ガス中のダイオキシン類の測定方法
JIS K0901　気体中のダスト試料捕集用ろ過材の形状、寸法並びに性能試験法
JIS R3503　化学分析用ガラス器具
JIS R3505　ガラス製体積計
JIS Z8808　排ガス中のダスト濃度の測定方法
JIS Z9020　管理図－一般指針
JIS Z9021　シューハート管理図

なお、精度管理については、環境省において公表している「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き（生物検定法）」及び「ダイオキシン類の環境測定を外部に委託する場合の信頼性の確保に関する指針」を参照するとともに、高分離能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いる場合にあっては、「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理指針」を参照する。

第３節　用語の定義

本マニュアルで用いられる用語の定義を以下に説明する。なお、各測定方法に固有の単語については、第 3 章及び第 4 章各論において、説明する。

1) **TEF**　毒性等価係数（2,3,7,8-TeCDD Toxicity Equivalency Factor)。ダイオキシン類の各異性体の毒性の強さを、ダイオキシン類の中で最強の毒性を有する異性体である 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシンの毒性を 1 としたときの相対的な値として表したもの。

2) **TEQ**　毒性等量(2,3,7,8-TeCDD Toxicity Equivalency Quantity)。ダイオキシン類の量（ダイオキシン類全体の毒性の強さ）を表すものであり、ダイオキシン類の各異性体の量を 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシンの毒性に換算し、合計したもの。

3) **WHO-TEF**　WHO/IPCS(2006)の TEF

4) **HRGC/HRMS**　高分離能ガスクロマトグラフ質量分析計。ガスクロマトグラフのカラムとしてキャピラリーカラムを用い、分解能が 10,000 以上の二重収束形質量分析計を組み合わせたもの。

5) **2,3,7,8-TeCDD**　2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン)

6) **PCDD**　ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(ポリクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン)

7) **PCDF**　ポリ塩化ジベンゾフラン(ポリクロロジベンゾフラン)

8) **生物検定法**　物質の量や構成成分、効力を、その物質を与えられた生物の反応から推定する方法。バイオアッセイ(生物学的定量法)ともいう。

9) **コプラナーPCBs**　ポリ塩化ビフェニルのうち、オルト位(2, 2’, 6 及び 6’)に置換塩素をもたない化合物(ノンオルト体)及び 1 個ある化合物(モノオルト体)の中で、PCDD や PCDF と似た毒性を有するものとして規定されている 12 種の化合物。ダイオキシン様 PCBs、DL-PCBs ともいう。

10) **抗原**　抗原抗体反応又は免疫応答を誘発しうる物質の総称。免疫原性をもつ完全抗原に対して、比較的小さな分子で免疫原性をもたない抗原をハプテンという。ダイオキシン類はハプテンであり、適当な担体と結合させることで抗原性がでてくる。

11) **抗体**　免疫反応において、抗原の刺激によって生体内に作られ、その抗原と特異的に結合するタンパク質の総称。

12) **プロモーター**　mRNA 合成（DNA から RNA を合成する段階；転写）の開始に関与する DNA 上の特定領域の短い塩基配列のこと。

13) **融合細胞**　モノクローナル抗体を産生させるために複数の細胞を融合させてできた細胞のこと。ハイブリドーマともいう。

14) **ダイオキシン類応答性組換え細胞**　ヒト、マウス、ラット、モルモットなどのほ乳類由来の培養細胞に、同種のほ乳類由来のダイオキシン類応答配列を含むプロモーター等にルシフェラーゼレポーター遺伝子を融合したプラスミドを導入したもの。

15) **レポータージーンアッセイ**　遺伝子発現を調節する転写プロモーターの特性や活性、又はそのプロモーターに結合する転写因子の活性を生物学的に測定する手法。目的遺伝子の転写プロモーターをβ－ガラクトシダーゼやルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子上流に挿入した人工遺伝子を作成し、細胞内に導入して、レポーター遺伝子の発現を酵素の活性や生物化学発光を測定することによって定量化する。

16) **抗原抗体反応**　抗原とそれに対応する抗体との特異的な結合によって起こる反応。

17) **免疫測定法**　免疫反応を利用して，微量物質の検出・定量を行う生化学的手法。抗体が抗原認識部位(ダイオキシン類)と特異的に結合する反応を利用し、試料中のダイオキシン類濃度を測定する方法である。

18) 実測濃度　各生物検定法において定められた標準物質を用いて検量線を作成し、それに基づいて得られた、試料中ダイオキシン類の標準物質に相当する濃度。

19) 測定量(毒性等量)　生物検定法においては、実測濃度について対象測定媒体別に定められる方式により換算を行って得られた値。

20) RLU　（相対）発光量（Relative Light Unit）。本マニュアルでは、レポータージーンアッセイにおいてルシフェラーゼが基質と作用する際に生じる発光の強さを指す。

21) 吸光度　物質が光を吸収する度合いを透過率の逆数の常用対数で表した数値。

22) HRGC/HRMS 法　高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた方法。本マニュアルでは以下の方法を指す。

・排出ガス：JIS K0311 に定める方法

・ばいじん及び燃え殻：平成 16 年環境省告示第 80 号（ダイオキシン類対策特別措置法施行規則第二条第二項第一号の規定に基づき環境大臣が定める方法）に定める方法

23) m^3_N　0℃ 、101.3kPa(760mmHg)における気体の体積(立方メートル)

24) μg　マイクログラム(Microgram：100 万分の1g：10^{-6}g)

25) ng　ナノグラム(Nanogram：10 億分の1g：10^{-9}g)

26) pg　ピコグラム(Picogram：1 兆分の1g：10^{-12}g)

27) 試料における検出下限　検出できる試料中の最小濃度。本マニュアルでは、標準物質における検出下限から理論的に算出する。

28) 試料における定量下限　定量が可能な試料中の最小濃度。本マニュアルでは、標準物質における定量下限から理論的に算出する。

29) 標準物質における検出下限　分析方法（生物検定法）において検量線作成用標準物質から求めた、検出が可能な標準物質の最小濃度。

30) 標準物質における定量下限　分析方法（生物検定法）において検量線作成用標準物質から求めた、定量が可能な標準物質の最小濃度。

第 4 節　測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、以下に列挙する 10 種類の生物検定法のいずれかにより定量する。生物検定法を用いた測定のフローを図 1-1 に示す。

1) ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体に結合することを利用した方法

(1) 前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 1)

(2) 前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 2)

(3) 前処理に、多層カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 3)

(4) 前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流法を利用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4ⅡE-luc を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 4)

(5) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR-EcoScreen を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 5)

(6) 前処理に、硫酸及び多層シリカゲルカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類、アリール炭化水素受容体及びアリール炭化水素受容体核運搬タンパク質の複合体形成反応を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 6)

2) ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法

(1) 前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 1)

(2) 前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び酵素標識抗原を用いた直接競合酵素免疫測定法を利用して、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 2)

(3) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相化抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 3)

(4) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 4)

（注意）ダイオキシン類を取り扱う場合は、吸入、誤飲、直接皮膚への接触等を避け、前処理室及び分析室の換気並びに廃液や廃棄物の管理は十分に行うこと。また、その他の薬品、溶媒等でも吸入や誤飲によって測定者の健康を損なうものがあるので、取り扱いはできるだけ慎重に行い、実験室の十分な換気に注意する。

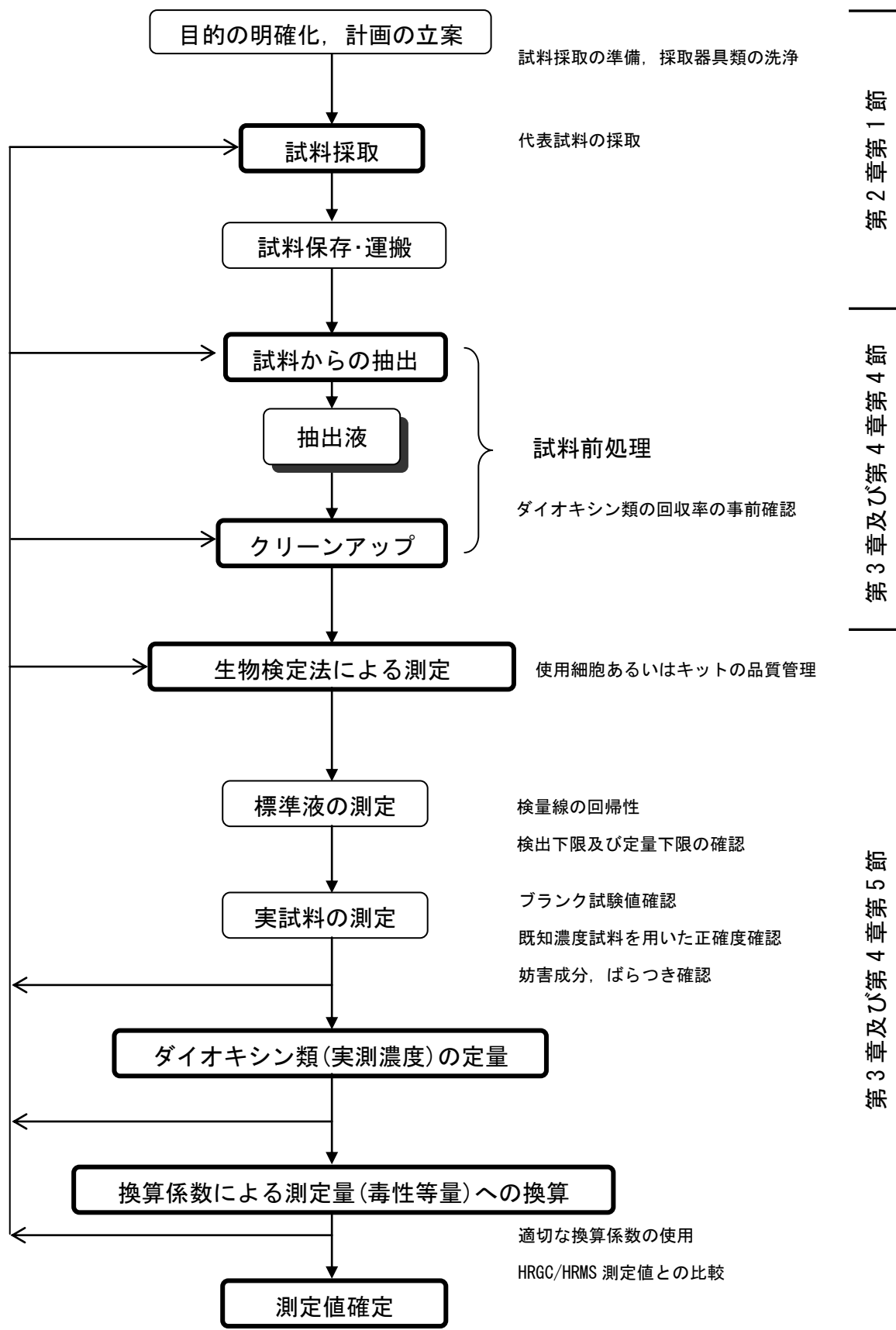



図 1-1　生物検定法によるダイオキシン類測定のフロー

第２章　各論（生物検定法に共通する事項）

本章では、第 3 章及び第 4 章で掲げる各生物検定法に共通する事項として、試料採取方法、測定結果の報告及び測定データの精度管理について説明する。

第１節　試料採取方法

１．排出ガス

試料ガス採取の一般的事項は JIS K0095 による。また、ダイオキシン類測定のための試料ガス採取方法は JIS K0311「5. 試料ガスの採取」及びダイオキシン類対策特別措置法施行規則(平成 11 年総理府令第 67 号、以下「規則」という。）第 2 条第 1 項第 1 号に規定するものとする。

1.1　試料採取の概要

排出ガス試料の採取手順の概略を図 2-1 に示す。

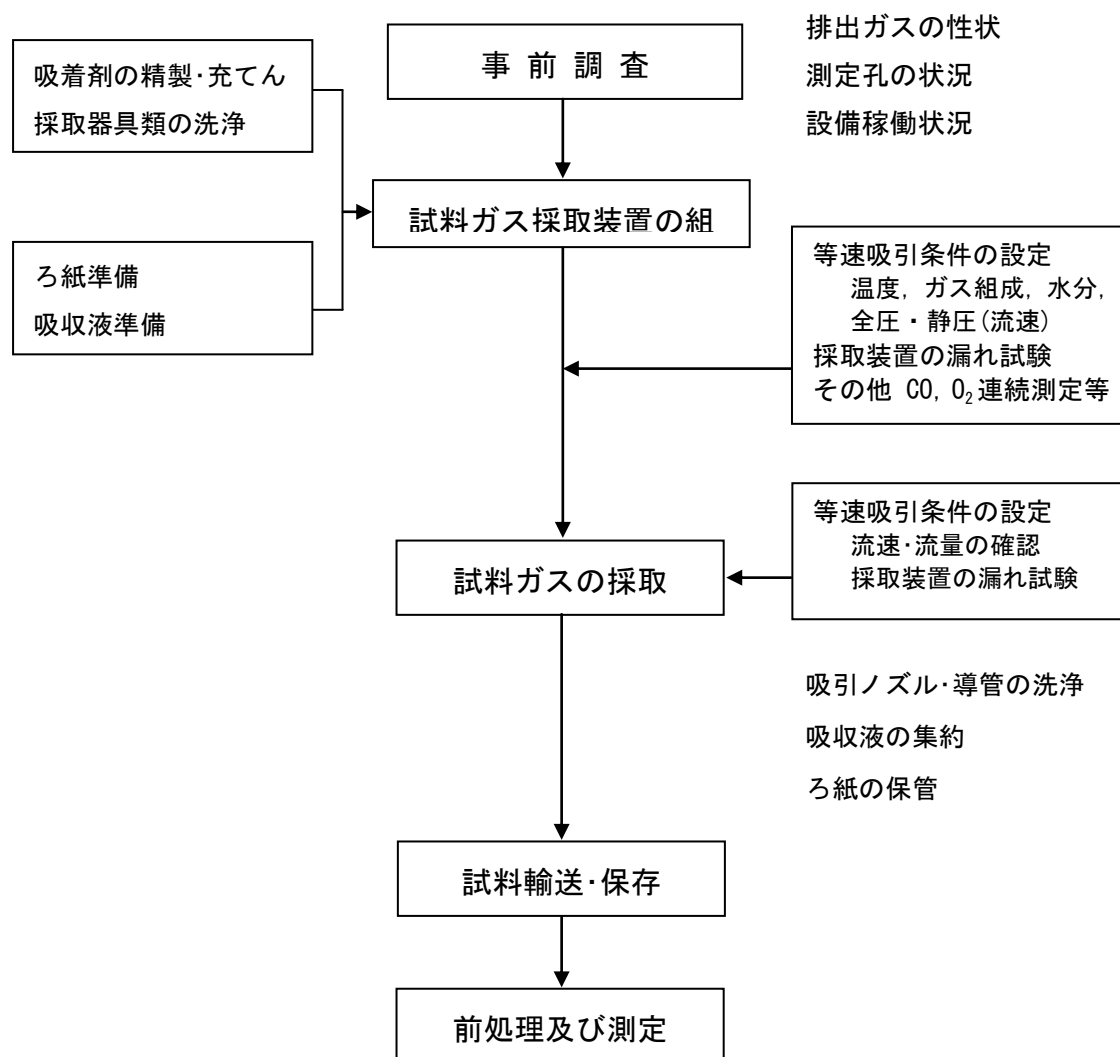



図 2-1　試料ガスの採取の作業手順

1.2　試薬

JIS K0311「5.3 試薬」に準拠したもの。

1.3　試料採取装置

JIS K0311「5.2 試料ガス採取装置」に準拠したもの。本マニュアルでは、原則として、JIS K0311 の附属書 1 の JIS I 形又は II 形の試料採取装置を用いることとし、III 形装置を用いる場合は、JIS K0311 の 5.2 に従い採取装置の妥当性を確認し、記録を作成する。

1.4　試料ガスの採取の準備

JIS K0311「5.4 試料ガスの採取の準備」に準拠した方法。ただし、5.4.3 の内標準物質の添加は行わない。

1.5　試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。排出ガスの採取に当たっては、通常の操業状態において(燃焼状態が安定した時点から約一時間以上経過した後を目途とする)、原則 4 時間以上採取する。なお、採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。各方法の具体的な算出方法については、第 3 章及び第 4 章に記載する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times v \times k}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V ： 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg-TEQ/mL)

v ： 測定用試料の液量(mL)

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数(各方法固有の排出ガスの換算係数)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

C_{DL} ： 必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m^3N)

また、本数式については代表的な例であり、各方法により数式が異なることから、詳しくは第 3 章及び第 4 章に記載する各方法に記載する数式により算出することとする。なお、標準物質における検出下限は、各方法により反応溶液(培地あるいは緩衝液と標準物質を含む DMSO 溶液の混合液)の標準物質の濃度か、添加した標準物質(DMSO 溶液中)の濃度かが異なることに留意する必要がある。

1.6　採取操作

JIS K0311「5.6 採取操作」に準拠した方法。

1.7　試料の回収及び保存

JIS K0311「5.7 試料の回収及び保存」に準拠した方法。

1.8　試料採取量の算出

JIS K0311「5.8 試料ガスの採取量の算出」に準拠した方法。

1.9　試料ガスの採取の記録

JIS K0311「5.9 試料ガスの採取の記録」に準拠した方法。

２．ばいじん及び燃え殻

2.1　試料採取の概要

ばいじん及び燃え殻、それらの処理物の採取方法は、平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に規定するものとする。

2.2　試薬及び器具

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠したもの。

2.3　採取の準備

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.4　ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。各方法の具体的な算出方法については、第３章及び第４章に記載する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times v \times k}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、　W　：測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(pg-TEQ/mL)

v　：測定用試料の液量(mL)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数(各方法固有のばいじん及び燃え殻の換算係数)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液量分取量(mL)

C_{DL}　：必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

また、本数式については代表的な例であり、各方法により数式が異なることから、詳しくは第３章及び第４章に記載する各方法に記載する数式により算出することとする。なお、標準物質における検出下限は、各方法により反応溶液(培地あるいは緩衝液と標準物質を含む DMSO 溶液の混合液)の標準物質の濃度か、添加した標準物質(DMSO 溶液中)の濃度かが異なることに留意する必要がある。

2.5　採取操作

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.6　試料の回収及び保存

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.7　分析試料の調製

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法。ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない。

2.8　含水率

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法。

参考　　平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)

(1) 試料採取

焼却施設から排出される試料として代表的な試料を採取する。ばいじん及び燃え殻が分離して排出される焼却施設においては、ばいじん及び燃え殻をそれぞれ採取する。この場合において、焼却施設内でばいじん又は燃え殻を処理するときは、ばいじん又は燃え殻を処理したものを採取する。

ア　排出ピット等から、シャベル、スコップ等の採取具を用いて数箇所から採取し、容器(アルミ製バット等のダイオキシン類の吸着のない材質製のものに限る。)に移し入れ、不燃物等の異物を取り除き、十分に均一化する。

イ　均一化した試料を保存容器(ガラス製等のダイオキシン類の吸着のない材質製のものであって、密封できるものに限る。)に入れる。採取量は、試料の調製後に 150g 程度の試料を確保できる量とする。

ウ　保存容器を密封し、遮光された容器に収納する。

(2) 試料の前処理

ア　試薬

日本工業規格 K0311 の 6.2 に規定するものを用いる。

イ　器具及び装置

日本工業規格 K0311 の 6.3 に規定するものを用いる。

ウ　試料の調製等

(ア)　試料の調製

①　灰試料の場合は、5mm の目のふるいを用いてふるい分けし、風乾後、乳鉢中で均一にすりつぶして混合する。

②　固化物試料の場合は、試料を粒径 2mm 程度以下まで粉砕する。

③　汚泥の場合は、試料を湿状のまま秤量する。この場合において、汚泥に含まれる固形分の重量比は、当該汚泥 20g 以上 100g 以下(Ag)を平型量り瓶(容量 50mL 以上のもので、あらかじめ乾燥したものに限る。)又は蒸発皿(容量 100mL 以上のもので、あらかじめ乾燥したものに限る。)に正確に計り取り、沸騰しないように注意して水分を蒸発させ、105℃以上 110℃以下で 2 時間程度乾燥させ、デシケーター中で 30 分間程度放冷させた後、当該平型量り瓶又は蒸発皿に残留した物質の重量(Bg)を正確に求め、これを固型分の重量とし、次に掲げる式により求める。

固型分の重量比(%)＝B／A×100

(イ)　内標準物質の添加

(ア)の操作により調製した試料 20g 以上 100g 以下をビーカーに秤取し、日本工業規格 K0311 の 6.4.1 に規定する方法により、ダイオキシン類内標準物質を加える。

エ　抽出

(ア)　ウの操作で得られた試料について、日本工業規格 K0311 の 6.4.2a)に規定する方法により塩酸処理及び洗浄を行い、ソックスレー抽出を行う。

(イ)　(ア)の操作で得られた塩酸溶液及びメタノール又はアセトン洗浄液を分液漏斗に入れ、溶液 1*l* 当たりジクロロメタン 50mL で 3 回、液―液振とう抽出を行い、硫酸ナトリウムを用いて脱水する。

(ウ)　(ア)及び(イ)の操作で得られた抽出液を合わせて溶媒を加え、一定量とし、抽出液とする。

(以下、省略)

第２節　測定結果の報告

本マニュアルに定める方法により測定を行った結果は、規則様式第 6(図 2-2)の表 1 又は 3 の該当する事項及び別紙 2(図 2-4)に記載する。その場合、規則様式第 6 の表 1 又は 3 の備考欄に簡易測定法による測定であることが分かるように「簡易測定法」と明記すること。

別紙 2 の測定方法の欄には、測定に用いた方法を記載するが、平成 17 年環境省告示第 92 号中の当該測定方法の番号(例：第 1 の 4）を記載しても差し支えない。

実測濃度の欄には、毒性等量に補正する前の濃度(つまり、各測定方法で規定される検量線より求められる測定値であり、媒体ごとに換算されていない値)を記載し、測定量の欄には、毒性等量に換算後の値を記載することとする。なお、排出ガスの実測濃度及び測定量は、従来の HRGC/HRMS 法と同様に、標準酸素補正後の値を記載すること。標準酸素補正の方法は本マニュアルの第 3 章又は第 4 章に記載している。

また、試料における定量下限及び検出下限の欄には、原則として実測濃度を記載するが、誤解のないよう単位も併せて記載することとする。

このほか、別紙 2 の備考欄には、基準値近傍の値である場合はその旨を、及び再測定を行った場合は別紙 1(図 2-3)に記載された当該再測定結果との対応等を明記することとする。

様式第６（第８条関係）

ダイオキシン類測定結果報告書

年　　月　　日

都道府県知事
市　　　　長　殿

報告者　氏名又は名称及び住所並びに法人にあってはその代表者の氏名　印

ダイオキシン類による汚染の状況について測定したので、ダイオキシン類対策特別措置法第２８条第３項の規定により、次のとおり報告します。

表１　排出ガス

採取年月日及び時刻(開始時刻～終了時刻)	排出ガス量(m³N／日)	排出ガス中の酸素濃度(%)	測定箇所	特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(ng―TEQ／m³N)	試料採取者	分析者	備考

表2　排出水

採取年月日及び時刻	測定場所		特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(pg―TEQ／L)	採水者	分析者	備考
	名称	排水量(m³／日)						

表３　ばいじん等

採取年月日及び時刻	試料の種別	採取箇所	特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(ng―TEQ/g)	試料採取者	分析者	備考

備考　１　報告書及び別紙の大きさは、日本工業規格Ａ４とすること。
　２　ダイオキシン類対策特別措置法施行規則（以下「規則」という。）第３条第１項に基づき換算した測定結果については、別紙１を添付するものとする。
　３　規則第３条第２項に基づき換算した測定結果については、別紙２を添付するものとする。
　４　２以上の測定結果がある場合は、添付する別紙１又は２のそれぞれとの対応関係がわかるように備考欄に記載すること。
　５　排出ガスにあっては表１、排出水にあっては表２、ばいじん及び焼却灰その他の燃え殻（以下「ばいじん等」という。）にあっては表３に記載すること。なお、同一届出者が大気基準適用施設及び水質基準対象施設をともに設置している場合には、併せて１葉の様式に記載すること。
　６　排出ガス量については、温度が零度であって圧力が１気圧の状態（以下「標準状態」という。）における量に、測定結果については、標準状態における排出ガス１立方メートル中の量に、それぞれ換算したものとする。
　７　２以上の水質基準対象施設を設置し、異なる排水系統を有する水質基準適用事業場にあっては、それぞれの排水系統の排水口ごとに測定を行い、結果を記載すること。
　８　表３の試料の種別として、ばいじん、焼却灰、混合灰又はこれらの処理物（処理方法）の別を記載すること。
　９　氏名（法人にあってはその代表者の氏名）を記載し、押印することに代えて、本人（法人にあってはその代表者）が署名することができる。

図 2-2　規則様式第６

様式第６（第８条関係）

別紙１　　　　　　　　規則第３条第１項に基づき換算したダイオキシン類の構成

整　理　番　号		実測濃度	試料における定量下限	試料における検出下限	毒性等価係数	毒性等量
ポリ塩化ジベンゾフラン	2，3，7，8—TeCDF				0.1	
	1，2，3，7，8—PeCDF				0.03	
	2，3，4，7，8—PeCDF				0.3	
	1，2，3，4，7，8—HxCDF				0.1	
	1，2，3，6，7，8—HxCDF				0.1	
	1，2，3，7，8，9—HxCDF				0.1	
	2，3，4，6，7，8—HxCDF				0.1	
	1，2，3，4，6，7，8—HpCDF				0.01	
	1，2，3，4，7，8，9—HpCDF				0.01	
	OCDF				0.0003	
	Total　PCDFs	—	—	—	—	
ポリ塩化ジベンゾ－パラ－ジオキシン	2，3，7，8—TeCDD				1	
	1，2，3，7，8—PeCDD				1	
	1，2，3，4，7，8—HxCDD				0.1	
	1，2，3，6，7，8—HxCDD				0.1	
	1，2，3，7，8，9—HxCDD				0.1	
	1，2，3，4，6，7，8—HpCDD				0.01	
	OCDD				0.0003	
	Total　PCDDs	—	—	—	—	
Total(PCDFs＋PCDDs)		—	—	—	—	
コプラナーポリ塩化ビフェニル	3，4，4’，5—TeCB(＃81)				0.0003	
	3，3’，4，4’—TeCB(＃77)				0.0001	
	3，3’，4，4’，5—PeCB(＃126)				0.1	
	3，3’，4，4’，5，5’—HxCB(＃169)				0.03	
	2’，3，4，4’，5—PeCB(＃123)				0.0003	
	2，3’，4，4’，5—PeCB(＃118)				0.0003	
	2，3，3’，4，4’—PeCB(＃105)				0.0003	
	2，3，4，4’，5—PeCB(＃114)				0.0003	
	2，3’，4，4’，5，5’—HxCB(＃167)				0.0003	
	2，3，3’，4，4’，5—HxCB(＃156)				0.0003	
	2，3，3’，4，4’，5’—HxCB(＃157)				0.0003	
	2，3，3’，4，4’，5，5’—HpCB(＃189)				0.0003	
Total　コプラナーPCB		—	—	—	—	
Total　ダイオキシン類		—	—	—	—	
備考						

備考
1. 排出ガスの測定結果を記入する場合にあっては、単位をng／m^{3}N（毒性等量にあっては、ng—TEQ／m^{3}N。）、排出水の測定結果を記入する場合にあっては、単位をpg／L(毒性等量にあっては、pg—TEQ／L。)とし、ばいじん等の測定結果を記入する場合にあっては、単位をng／g（毒性等量にあっては、ng—TEQ/g。）とする。
2. 実測濃度の項において、検出下限以上定量下限未満の濃度は括弧付きの数字で記載すること。
3. 実測濃度の項において、検出下限未満のものは“ＮＤ”と記載すること。
4. 毒性等量は、定量下限未満の実測濃度を零として算出すること。
5. 規則第2条第1項第4号の規定に基づき環境大臣が定める方法により測定を行った場合は、備考欄に測定に用いた方法を記載すること。
6. 用語の定義は、日本工業規格Ｋ0311、Ｋ0312又は規則第2条第1項第4号の規定に基づき環境大臣が定める方法によること。
7. 整理番号は、測定結果が複数の場合に記入すること。

図 2-3　規則様式第６別紙１

別紙２

規則第３条第２項に基づき換算したダイオキシン類の測定方法

整理番号	測定方法	実測濃度	試料における定量下限	試料における検出下限	測定量（毒性等量）	備　考

備考　1　排出ガスの測定結果を記入する場合にあっては、単位をng／m^{3}N（毒性等量にあっては、ng―TEQ／m^{3}N。）とし、ばいじん等の測定結果を記入する場合にあっては、ng／g（毒性等量にあっては、ng―TEQ／g。）とする。

2　測定方法の項においては、規則第２条第１項第４号の規定に基づき環境大臣が定める方法のうち、測定に用いた方法を記載すること。

3　実測濃度の項においては、２の測定方法により測定された標準溶液相当濃度を記載すること。

4　実測濃度の項において、検出下限以上定量下限未満の濃度は括弧付きの数字を記載すること。

5　実測濃度の項において、検出下限未満のものは“ＮＤ”と記載すること。

6　定量下限未満の実測濃度の測定量（毒性等量）は、零とすること。

7　用語の定義は、規則第２条第１項第４号の規定に基づき環境大臣が定める方法によること。

8　整理番号は、測定結果が複数の場合に記入すること。

図 2-4　規則様式第６別紙２

第３節　測定データの精度管理

ダイオキシン類の測定は、極めて低濃度の測定であるため、測定精度の管理を十分に行う必要がある。このため、分析操作の際には次のような作業を行う。これらの頻度等の詳細については、本節 1～5 にて説明する。

1) **検出下限及び定量範囲の確認**(標準物質における検出下限及び定量範囲の確認並びに試料における検出下限及び定量下限)
2) **ブランク試験**(試料採取、前処理時に使用する試薬等の汚染のレベルを確認するブランク試験(以下「操作ブランク試験」という。)並びに試料採取及び試料運搬における汚染を確認するためのブランク試験(以下「トラベルブランク試験」という。))
3) **二重測定**
4) **濃度既知試料の測定**
5) **回収率の確認**
6) **換算係数の確認**
7) **検量線の確認及び感度変動の管理図による確認**

また、各操作工程において、本節 1～5 に掲げる事項について適切に行うことが望ましい。なお、精度管理については、本マニュアルに加え、ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き(生物検定法)も参照されたい。

１．試薬等、器具、装置及び施設の管理

以下の事項について記録等を作成・保存する。

1.1 試薬等

使用する試薬について、使用目的に応じて整理した上で、測定方法に定められたものであることを確認し、メーカー、製品名、ロット番号、購入日、購入量、開封日、有効期限及び保存方法等を記録する。

なお、有効期限の定められていないものについては、開封又は調製後の使用有効な期間を定め、それを記録する。

キット化されている試薬等については、そのキットに同梱されている試薬等をキット間で流用せず、使い切ること。

購入した試薬から精製・洗浄、その他の調製を行った二次的な調製試薬については、調製作業を行った者、作業日及び作業の内容、使用期限、保存方法及び調製に使用した試薬等についてトレーサビリティを確実にする情報を記録する。

また、細胞又はキットを入手した場合、入手の情報(納入業者、担当者名、納入温度、時間及び梱包の破損の有無等)及び細胞については品質保証書について整理、保存する。細胞又はキットを保存する場合は、必要に応じ、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度等の情報を記録、保存する。なお、細胞又はキットについては、停電や細胞保存容器からの液体窒素漏れといった万が一の事態に備えて、分散保管する等の対策を講じることが望ましい。

1.2　標準物質（溶液）

標準物質（溶液）については、1.1 の使用する試薬における記録に加え、使用日及び使用量を記録する。な

お、標準溶液を購入した場合には、購入時の濃度（複数の標準物質を含むものにあっては各々の濃度）を記録する。

1.3　器具

使用する器具について、使用目的に応じて整理した上で、測定方法に定められたものであることを確認し、メーカー、製品名及び洗浄等の処理（作業を行った者、作業日及びその内容）、保管方法を記録する。また、マイクロピペットの吸い込みによるピペット本体内部汚染防止等、器具の汚染防止に関する記録を作成する。なお、必要に応じて高濃度試料測定用器具と低濃度試料測定用器具とを区別し、両者が明確に識別できるように措置し、その内容を記録する。点検及び校正が必要な器具については、定期的にそれらの実施に関する記録を作成する。

1.4　装置

使用する装置について、使用目的に応じて整理した上で、測定方法に定められたものであることを確認し、メーカー、製品名、点検及び校正の実施状況並びに日常の測定における管理状況を記録する。装置の修理等を行った場合には、修理伝票の保存とともに修理等の状況を記録する。

細胞を使用する場合は、雑菌汚染やインキュベーターの故障等のトラブルに備えて、予備のインキュベーターを保有する等の対策を講じ、また、定期的にインキュベーターを清掃する等、適切な細胞培養環境の維持管理を行う。

1.5　施設

試料搬入後の一連の業務がどのような作業環境で実施されているかを判断できる文書を作成する。

特に試料の前処理及び生物検定法による測定の作業環境については、精度管理の観点からどのような配慮がなされているかを記述する。例えば、定期的に温度、湿度及び差圧等の条件について記録を取っておく。

同一施設で HRGC/HRMS 法によるダイオキシン類分析を行っている場合は、内標準物質による汚染が生じないような対策を講じる。

なお、作業環境については、以下の要件を満たす施設を有することとし、精度管理の観点からどのような配慮がなされているかを記述する。

1) 遺伝子組換え培養細胞を用いたレポータージーンアッセイによる試験実施施設

(1) 試験施設は、培養細胞の培養細胞の保存、保存処理、継代培養、前処理及び測定等を行うための専用区域を有し、試験実施中に使用される試薬の調製並びに保管、また、器具及び機器の滅菌、維持管理並びに保管等が可能であること。

(2) 当該施設は、雑菌汚染等により培養細胞に与える影響が最小限に抑制されていること。

(3) 遺伝子組み換え培養細胞の使用に当たって、自治体等による運用規則等が定められている場合には該当する規則を遵守すること。

2) 抗原抗体反応を利用したキットによる試験実施施設

試料搬入後の一連の業務がどのような作業環境で実施されているかを判断できる文書を作成する。特に試料の前処理及びキットに対するピペッティング操作やプレートリーダー等による測定の作業環境については、精度管理の観点からどのような配慮がなされているかを記述する。

1.6　環境汚染の防止及び作業者暴露の防止

分析環境については、環境へ漏洩防止及び廃棄物処理等の環境汚染の防止並びに作業者暴露の防止についても関連法規等を遵守の上、十分な対策を講じる。

1.6.1　廃棄物処理

実験施設で発生した廃液及び廃棄物は汚染区分を設け、区分ごとに処理方法を明確にし、処分する。このうち、廃棄するものは、廃棄物処理業者に委託する等適正に処理されることとなるまで密閉容器に保管し、廃棄物保管室に保管することとする。

1.6.2　安全性確保

生物検定法によるダイオキシン類分析施設は、試料採取や分析を行う作業従事者の安全及び健康を確保するとともに、施設周辺環境への汚染を防止することを第一とし、これを達成するための施設の構造、設備等を備えることとする。

1) 分析室

前処理室、生物検定法による測定室、標準試料室及び廃棄物保管室といった各ダイオキシン類の分析関連室への出入りは関係者に限定し、分析室のドア等に「関係者以外立入禁止」の表示を掲げる等して管理を行うこと。

また、各分析室は、機密性を確保するとともに負圧にし、ダイオキシン類の流出を防止すること。また、排気及び排水設備の出口には、活性炭フィルターや活性炭槽を設置する等して、環境へのダイオキシン類放出を防止すること。

2) 試料採取現場での安全管理

試料採取現場内での作業中は、安全用保護具を着用すること。特に飛灰の採取時は、防じんマスク・防じんメガネ等を使用すること。

作業終了後、手洗い、うがいを行い空気中浮遊粉じんを摂取しないよう注意すること。

また、試料採取に使用した機器類を測定場所から持ち帰る時は、測定作業中に堆積した粉じんの払い落としを行う等、ダイオキシン類汚染粉じん等による環境汚染に留意すること。

3) 前処理工程での安全管理

標準試料の取り扱いに際しては、危険性の程度に応じて、ドラフト(安全キャビネット)、グローブボックス等を適宜用いる。前処理工程時は、排気ファンを運転した状態で作業を行うこと。

また、飛散する可能性の高い試料を取り扱う場合は、飛散しないよう注意して取り扱うと共に、防じんメガネ、防じんマスク及び使い捨てゴム手袋等を着用し、試料の吸引及び皮膚への直接接触を避けること。

4) 生物検定法による測定時の安全管理

培養細胞を用いるレポータージーンアッセイを行う場合、標準試料及び測定試料を曝露する際には、無菌状態の確保、ダイオキシン類による汚染防止の観点から安全キャビネット(例えば、JIS K3800 に規定するバイオハザード対策用クラス II キャビネット等）を使用することが望ましい。

また、抗原抗体反応を利用した方法では、無菌状態を確保する必要はないが、ドラフト等ダイオキシン類による実験室の汚染を防止できる設備を使用することが望ましい。

5) 緊急時の対応

ダイオキシン類による汚染、被曝、漏洩、標準物質の紛失等、あるいはそれらのおそれがある場合、速やかに関係者に連絡、対処をしなければならない。このため、事故発生時等の緊急時の警報等の連絡システム、緊急処置設備等を整備しておくこと。

6) 健康管理

作業従事者には労働安全衛生法による健康診断を実施するとともに、必要に応じ検査項目を追加することができるものとする。健康診断の結果、異常が認められた場合には速やかに措置を講ずるものとする。

7) 安全教育

安全管理指針(規定)を作成するとともに、作業従事者に対して分析施設、設備の周知を図り、ダイオキシン類の取り扱い、廃棄物の取り扱い等の教育訓練を実施する。

2．試料採取

排出ガスについては、定期的に JIS K0311 に基づく測定を行い、サンプリングスパイクの回収率が 70～130%の範囲内であることを確認することが望ましい。操作に当たっては、本マニュアル及び JIS K0311「附属書 1(規定)試料ガス採取装置」に記載の「操作上の注意」に従って試料採取を行う。

ばいじん及び燃え殻の操作に当たっては、本マニュアル及び平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)に従って試料採取を行う。

この他、下記について留意して試料採取を行う。

2.1　試料採取計画

1) 事前調査

事前調査の必要性について検討し、必要と認める時は事前調査を行う。また、事前調査結果を 2)の試料採取計画に反映させる。

2) 試料採取計画

試料の採取に際して、試料採取計画を作成する。

2.2　試料採取の実行に係る判断

前日及び当日の天候（項目によっては数日前の天候についても考慮する。）その他の状況を踏まえ、試料採取担当者は、試料採取の実行の可否について判断し、可とした場合には試料採取を実施し、不可とした場合には、その経過を記録する。

2.3　試料採取の記録

試料採取計画に基づき、試料採取を実施し、以下の記録を作成・保存する。なお、特殊事情により本マニュアルに記載していない方法を講じた場合には、その理由、内容及び妥当性（比較検討結果及び引用文献等）を試料採取計画に記録する。

1) 共通的事項

(1) 試料の名称

(2) 試料採取者

(3) 試料採取日時

(4) 試料採取地点名

(5) 採取地点及び場所に係る地図及びその状況に関する記述（必要に応じて、全地球測位システム　(GPS)等により求めた試料採取地点の緯度及び経度）

(6) 試料採取の実行に係る判断等

(7) 採取期間内の天候

(8) 試料採取時の写真（周辺の状況がわかる遠景写真及び試料採取状況がわかる近景写真の 2 種類。ただし、写真撮影が不可の場合には、必要としない。）

(9) 試料に影響を与えている可能性のある事項

(10) 試料採取量

(11) 試料採取後の輸送方法

2) 測定項目別の個別事項

(1) 排出ガス

a) 試料採取器具、装置及び使用した試薬等

- メーカー、形式及び模式図
- 採取管部（材質、ノズルの内径及び冷却装置の有無）
- フィルターの材質
- 液体捕集部（吸収瓶本数、容量及び吸収液の種類並びに量等）
- 吸着捕集部（吸着剤カラムの形状及び吸着剤の材質、商品名並びに量）
- 吸引ポンプ（形式及びメーカー名）
- 流量計（種類、形式、メーカー名及び校正結果）

b) 試料採取操作

- 事前調査（採取場所の地上からの高さ、測定孔の状況及び送排風機の位置等並びにダクトの形状等）
- 設定した試料ガスの採取量、採取時間及び等速吸引流量
- 漏れ試験の実施状況及び結果
- ガスメータの温度及び圧力
- フィルター捕集部及び液体捕集部の温度
- 等速吸引流量、吸引時間及び吸引ガス量
- 試料ガス採取量
- 排出ガスの温度、流速、組成、圧力及び水分量等

c) 試料容器

- 試料回収の方法
- 試料保存の方法（試料容器の材質及び容量等）

d) その他の追加事項

- 採取試料に係る発生源の規模及び稼働状況
- 酸素濃度による補正

(2) ばいじん及び燃え殻

a) 試料採取器具、装置及び使用した試薬等

- 採取器具の種類及び材質

b) 試料採取操作

- 試料の採取場所
- 試料採取操作の概要
- 試料採取量

c) 試料容器

- 試料保存の方法（試料容器の種別及び材質）

d) その他の追加事項

- 試料の状況
- 採取試料に係る発生源（焼却施設）の規模及び稼働状況

2.4　トラベルブランク試験及び二重測定

試料採取に当たって、トラベルブランク試験のための操作及び二重測定のための試料採取を行い、その実施状況を記録する。なお、トラベルブランク試験を実施する対象は、排出ガス試料採取とする。

トラベルブランク試験は、移送中に汚染が考えられる場合(ばいじん等による汚染)には必ず測定し、十分に低値であることを確認しなければならないが、それ以外の場合には、その管理を十分しておけば毎回測定しなくてもよい。二重測定についても、二重測定の実施が困難である場合を除き、測定試料数の 10%程度の頻度で行い、同一の生物検定法における定量下限以上の測定量（毒性等量）について、その平均値を求め、個々の測定量（毒性等量）が平均値の±30%以内であることを確認する。なお、二重測定用の試料採取を行わない場合には、試料採取の操作について十分な管理を行うことが必要である。

トラベルブランク試験又は二重測定を行わない場合には、試料採取における信頼性について十分検討しておき、必要があればそのデータが提示できるようにしておく。

３．試料の前処理

3.1　試料前処理計画

試料の前処理に際して、試料前処理計画を作成する。

3.2　試料の前処理に係る共通的事項

試料前処理計画に基づき次の作業を実施し、記録を作成・保存する。

1) 試料の受入検査

採取された試料が測定機関に搬入された段階で試料の状態等に関する受入検査を実施し、以下の事項について記録を作成する。

(1)　試料が搬入された日時及び受入検査を実施した日時

(2)　受入検査の実施者

(3)　試料搬入の手段及び状態

(4)　試料容器の種類及び大きさ

(5)　試料の性状

(6)　その他特記事項

2) 抽出操作を行うまでの試料の保存及び管理

受入検査を行った試料について、3)の抽出操作を行うまでの間、以下の記録を作成した上で適切な保存及び管理を行う。

(1)　試料の管理番号

(2)　試料の保存及び管理の場所、方法並びに期間

3) 試料からの抽出

試料からの抽出操作を行い、以下の記録を作成し、その内容が測定方法に定められた方法及び条件により行われたことを確認する。なお、特殊事情により本マニュアルに記載していない方法を講じた場合には、その理由、内容及び妥当性（比較検討結果及び引用文献等）を記録する。

また、抽出操作時の他試料による汚染を判断するための参考資料として、同時期に処理を行った試料のリストを作成する。

(1)　操作を行った者

(2) 操作を行った日時

(3) 抽出に供した試料の性状及び量

(4) 抽出のために使用した器具並びにその洗浄の実施状況及び使用するまでの保管の状況

(5) 抽出操作の方法及び条件（溶媒の種類、量及び抽出時間等）

4) 試料抽出液のクリーンアップ

試料抽出液のクリーンアップ操作を行い、以下の記録を作成し、その内容が測定方法に定められた方法及び条件により行われたことを確認する。なお、特殊事情により本マニュアルに記載していない方法を講じた場合には、その理由、内容及び妥当性（比較検討結果及び引用文献等）を記録する。

また、クリーンアップ操作時の他試料による汚染を判断するための参考資料として、同時期に処理を行った試料のリストを作成する。

(1) 操作を行った者

(2) 操作を行った日時

(3) 操作のために使用した試料抽出液の量

(4) 操作の方法及び条件

(5) 使用試薬の種類

a) 前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 1)

① 硫酸シリカゲル/活性炭カラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・活性炭の材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

b) 前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 2)

① 硫酸シリカゲル/活性炭カラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・活性炭の材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

c) 前処理に、多層カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 3)

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

② アルミナカラムクロマトグラフ操作の場合

・アルミナの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

d) 前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流法を利用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞

H4ⅡE-luc を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 4)

① 硫酸シリカゲル加熱還流処理

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

e) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR-EcoScreen を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 5)

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

② アルミナカラムクロマトグラフ操作

・アルミナの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

f) 前処理に、硫酸及び多層シリカゲルカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類、アリール炭化水素受容体及びアリール炭化水素受容体核運搬タンパク質の複合体形成反応を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 6)

① 硫酸処理操作

・ヘキサンの使用量

・硫酸の添加量及び添加回数

② 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

g) 前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 1)

① 硫酸処理

・ヘキサンの使用量

・硫酸の添加量及び添加回数

② 多層シリカゲルカラム/活性炭カラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・活性炭の材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

h) 前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類抗体及び酵素標識抗原を用いた直接競合酵素免疫測定法を利用して、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 2)

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

② 活性炭カラムクロマトグラフ操作

・活性炭の特質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

i) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 3)

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

② アルミナカラムクロマトグラフ操作

・アルミナの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

j) 前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシンモノクローナル抗体及び抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 4)

① 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作

・シリカゲルの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

② アルミナカラムクロマトグラフ操作

・アルミナの材質及び商品名、活性化条件並びに充填量

・溶出のために使用した溶媒の種類及び溶出液の量

3.3 試料の前処理に係る測定項目別の個別事項

試料の前処理に係る測定項目別の個別事項については、以下の通り。

(1) 排出ガス

- 捕集ダストの塩酸処理

(2) ばいじん及び燃え殻

- 試料の調製方法（粉砕情報及び粒径等）

3.4 測定用試料に併せて測定を行う試料の調製

ダイオキシン類の測定に係る品質が確保されていることの確認等を行うため、以下の試料について必要な前処理等を行い、4.5 において測定を行う試料として調製するとともに、調製を行った測定担当者の氏名、調製の日時及び調製操作の概要を記録する。

1) 操作ブランク試験のための試料

一連の測定業務において用意する試料である。操作時の汚染に対して十分な管理がなされており、その値が十分低値であれば毎回行わなくてもよいが、前処理操作に大きな変更があった場合、試料間汚染が予想されるような高濃度試料を測定した場合にも試料を調製する。

なお、操作ブランク試験は、測定用試料の調整等に起因する汚染を確認し、試料の測定に支障のない測定環境を設定するために行うものである。試料の採取及び前処理に用いるのと同じ試薬等を用いて試料と同様に行う。ブランク値が高い場合等は、試料測定値の補正に操作ブランク測定値を用いる必要があるが、ブランク試験の値が大きいと測定感度が悪くなるばかりでなく、測定値の信頼性が低下するため、ブラン

ク試験値は極力低減を図らなければならない。そのためには、クリーンドラフト内で前処理操作等を行うこと。

2) トラベルブランク試験のための試料

2.4 に基づきトラベル試験のための操作を行った試料について、前処理操作を行い調製した試料である。

なお、トラベルブランク試験は、試料について、試料採取準備時から試料分析時までの汚染の有無を確認するためのものである。試料採取操作以外は試料と全く同様に扱い持ち運んだものについて、試料と同様の前処理操作を行う。なお、ブランク試験の値が大きいと測定感度が悪くなるばかりでなく、測定値の信頼性が低下するため、ブランク試験値は極力低減を図らなければならない。

3) 二重測定のための試料

2.4 に基づき試料採取を行った二重測定用の試料について、前処理操作を行い調製した試料である。

なお、二重測定用試料は、試料採取、前処理操作及び測定操作における総合的な信頼性を確保するために、同一試料から 2 点以上採取し、測定に供する。

排出ガスについては、同一の試料を同時に 2 台以上の装置で採取する。ばいじん及び燃え殻については、試料採取、前処理操作及び測定操作における総合的な信頼性を確保するために、同一試料から 2 つ以上の測定試料について採取する。

4) 濃度既知試料

標準的な濃度既知試料であり、適切な頻度（例えば、一連の分析操作ごと）において、前処理から測定までの工程に精度管理上の問題が発生していないことを定期的に確認するために使用する試料である。問題が発生していると認められる場合は、さらに前処理及び測定操作等工程ごとに濃度既知試料を用いて確認し、原因の究明を行う。なお、前処理から測定までの確認は、適切な頻度で行われていれば、下記 5）換算係数の確認のための試料の分析をもって代えることができる。

5) 換算係数の確認のための試料

換算係数の確認のために調製する試料であり、片方は HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りは生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

6) 回収率の確認のための試料

生物検定法においては、標準物質の添加などによる回収率の確認は困難であるため、少なくとも 6 ヶ月に 1 回又は使用する試薬等の製造ロットが変わったときなどに、HRGC/HRMS 法に定められた方法により回収率を求める。

４．生物検定法による測定

4.1　生物検定法による試料の測定計画

測定に際し、生物検定法による試料の測定計画を作成する。

4.2　計測機器の点検

計測機器の点検に関する実施基準を作成し、この基準に基づき点検等を行い以下の記録を作成する。また、停電や故障等の問題が発生した場合には、どのような処置を講じたかを記録する。

1) 日常点検

(1)　点検を行った者及び点検を行った日時

(2)　各種消耗品に関する基本的な事項

2) 定期点検

(1) 点検を行った者及び点検を行った日時

(2) 点検の実施状況

3) メンテナンス

(1) 光源等の点検及び交換

(2) インキュベーター等の温度制御機能の点検及び修理

(3) その他

4) 問題が発生した時の処置

(1) 問題の内容及び講じた処置

4.3 測定系の準備

以下の 4.4～4.7 の操作を行うに当たり、培養細胞又はキットの準備を行い、これらの測定系が使用可能であることを確認した上で以下の記録を作成する。

また、遺伝子組み換え培養細胞ならびに抗ダイオキシン類抗体の活性がダイオキシン類の測定に必要とされる状態にあることについても確認する。

1) 凍結保存されているもの

(1) 解凍作業を行った者及び日時

(2) 凍結保存されている培養細胞又はキットの解凍操作

(3) 操作が測定に使用する上で問題がないことの確認記録（測定使用前の活性確認を含む）

2) 冷蔵保存されているもの

(1) 開封等作業を行った者及び日時

(2) 開封等の操作

(3) 測定に使用する上で問題がないことの確認記録

3) 常温保存されているもの

(1) 開封等作業を行った者及び日時

(2) 開封等の操作

(3) 測定に使用する上で問題がないことの確認記録

4) 細胞の管理状況

遺伝子組換え培養細胞を用いたレポータージーンアッセイにおいては、下記に示す細胞の管理状況についても確認及び記録を作成する。なお、細胞についてはその継代回数が精度管理上問題ない範囲内で試験に使用すること。

(1) 継代等の操作記録

(2) 培養条件の確認及び雑菌汚染等の有無の確認

(3) 細胞活性が維持されていることの確認

4.4 検量線の作成

検量線作成用標準液について、測定時の同一ロット内において測定を行い、必要なデータを求める。得られたデータが測定方法に定められた条件に合致していることを確認し、以下の記録を作成する。

(1) 検量線の作成者

(2) 検量線の作成日

(3) 測定条件

(4) 計測値（発光、吸光又は蛍光等の強度）

(5) 測定方法で定められている近似式及びその算出過程

4.5　試料の測定

生物検定法による試料の測定計画に基づき、検量線作成用標準液、測定用試料及び 3.4 で調製した試料について測定操作を実施し、必要なデータを集め、以下の記録を作成する。

(1) 測定操作を行った者

(2) 測定を行った日

(3) 測定条件

(4) 測定の順番

(5) 測定に供した試料量

(6) 計測値（発光、吸光又は蛍光等の強度）

4.6　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、本マニュアルに従い、検量線作成用標準液及び濃度既知試料のそれぞれに対しての測定操作により得られたデータから、測定量（毒性等量）を求め、管理図に記録し保存する。管理図による処置基準は、管理限界（μ±2σ）からの逸脱状況及び図の傾向等に応じて下記の通りとする。（μ:工程平均、σ:測定量（毒性等量）の標準偏差）

なお、管理限界は十分なサンプル数から σ を導出することとし、変動係数（CV%）で 20%以内に収まることが望ましい。

1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

また、原因究明を行い、再測定した結果が管理限界内とならない場合は、過去のデータを含めてその傾向を解析し、新たに管理限界を求める対象データの見直しを考慮する。

管理図より明らかとなる原因についての考察を例示する。

1) 良好な結果

(1) 管理限界内

2) 注意を要する結果（管理限界内）

(1) 中心線より下又は上に偏在傾向

a) 発色基質の劣化や酵素活性の低下等の発色感度低下

b) プラスミドの欠落等の細胞劣化

c) 試薬の汚染

(2) 一定の増加又は減少傾向

a) 発色基質の劣化や酵素活性の低下等の発色感度低下

b) プラスミドの欠落等の細胞劣化

c) 試薬の汚染

3) 改善を要する結果

(1) 1 点以上が管理限界超過

a) ピペッティング操作の不備（不良なチップ使用又はチップ取り付け不備によるリーク等）

b) 添加忘れ等の操作ミス

(2) 全ての点が管理限界超過

a) ピペッティング操作の不備（不良なチップ使用又はチップ取り付け不備によるリーク等）

b) 試薬や試料の混合不良

c) 反応温度不適・反応時間間違い

なお、JIS Z9021　シューハート管理図には、μ±2σ を警戒限界、μ±3σ を管理限界とする考え方も掲載されているが、本マニュアルでは、μ±2σ を管理限界とする。

4.7　検出下限等算出用検量線の作成

測定担当者は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回、検出下限及び定量範囲を求めるために、標準液について検量線を作成する。得られたデータが測定方法に定められた条件に合致していることを確認し、以下の記録を作成する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行い、記録を作成する。

(1) 検出下限等算出用検量線の作成者

(2) 検出下限等算出用検量線の作成日

(3) 測定条件

(4) 計測値（発光、吸光又は蛍光等の強度）

(5) 測定方法で定められている近似式及びその算出過程

５．生物検定法における定量結果の確定と結果の報告

以下の 5.1～5.4 の作業を行い、作成した記録及び 4.4～4.7 の記録を整理し、以下の 5.3 で算出した測定量(毒性等量)の精度に問題がないことを確認する。当該精度に問題がない場合は、以下の 5.5～5.11 の作業を行い、それらに精度管理上問題がないと認められる場合は、測定用試料の定量結果を確定する。5.3 で算出した測定量(毒性等量)及び 5.5～5.11 の作業において、精度管理上の問題を認めた場合には、適切な措置を講ずる。

5.1　検出下限及び定量範囲

1) 標準物質における検出下限及び定量範囲の算出

原則として、検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定量（毒性等量）の定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限、20%以下となる点を定量下限とし、この定量下限と本マニュアル第 3 章又は第 4 章に記載されている方法により算出された定量上限の間を定量範囲とする方法で算出し、結果を記録しておく。

この標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回十分な性能が得られていることを確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認する。

2) 試料における検出下限及び定量下限

基本的には試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、標準物質における検出下限及び定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、本マニュアルに従い試料ごとに求める。

5.2　実測濃度

1) 試料測定時の希釈倍率の設定

希釈倍率の公比は、希釈直線性の確認ができるように、定量範囲内に複数点のデータが入るように設定されることが望ましい。

実試料の測定において、検量線の直線性が得られる範囲内で複数点のデータが得られなかった場合は、希釈倍率の設定を見直し、再度測定することを考慮する。

2) 実測濃度の算出

本マニュアルに定められた方法により、実測濃度を算出し、その結果を記録する。また、実測濃度の算出に至った計算過程を説明できる資料を作成する。

5.3　測定量（毒性等量）の算出

本マニュアルに定められた方法により、測定量（毒性等量）を算出し、その結果を記録する。また、使用した換算係数等も含め、測定量（毒性等量）の算出に至った計算過程を説明できる資料を作成する。

5.4　再測定

記録の不備、操作ミス及び定量範囲の逸脱等、再測定の必要が生じた場合、その理由を記して再測定を行うとともに、その原因を追究して理由を明確にする。

5.5　操作ブランク試験

操作ブランク値を求め、結果が十分に低値であることを確認し、記録する。なお、操作ブランク試験の値が高い場合は、その原因を追及して理由を明確にする。

5.6　トラベルブランク試験

トラベルブランク値を求め、結果が十分に低値であることを確認し、記録する。なお、トラベルブランク試験の値が高い場合は、その原因を追及して理由を明確にする。

5.7　二重測定

二重測定用試料の測定量（毒性等量）を求め、結果を比較検討し、記録する。なお、二重測定の値の差が大きい場合は、その原因を追及して理由を明確にする。

5.8　濃度既知試料の測定

濃度既知試料の測定量（毒性等量）を求め、これまでに同一試料について測定した結果と比較検討し、記録する。なお、濃度既知試料を測定した結果が一定の範囲（例えば、当該濃度の±30%以内、又は標準偏差の 2 倍以内）を逸脱していた場合は、濃度既知試料を用いて、前処理及び測定操作等工程ごとに確認し、原因の究明を行う。

5.9　換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回又は使用する試薬等の製造ロットが変わったときなどに、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、本マニュアル記載の換算係数と比較し記録する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行い、比較結果を記録する。

本マニュアル記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

なお、HRGC/HRMS 法を用いる場合は、「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理指針」に留意することとする。

5.10　回収率の確認

生物検定法においては、試料の採取から前処理操作に至るまでの回収率を、標準物質の添加などによって

確認することは困難である。また、生物検定法によって得られた実測値を毒性等量に換算する際に用いる換算係数には、既に抽出及び前処理操作における回収率が考慮されている。そのため、少なくとも 6 ヶ月に 1 回又は使用する試薬等の製造ロットが変わったときなどに、HRGC/HRMS 法に定められた方法によって回収率の測定を行う。

このときの回収率が、50%～120%の範囲を逸脱していた場合は、抽出、前処理等の工程ごとに回収率を確認し、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

5.11　異常値及び欠測値の発生原因等

5.1～5.10 でデータの確定ができなかった異常値及び欠測値については、その原因等を検討し、その結果を記録する。また、異常値及び欠測値について、精度管理上問題がある場合については、再測定などの必要な措置を講じる。

5.12　試料等の保存

再測定に備えた試料等の保存及び管理を行い、その管理番号、保存及び管理の方法並びに期間を記録する。

第３章　各論(ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体に結合することを利用した方法)

その１　前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法 (平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 1)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポータージーンアッセイによる測定により定量する。測定方法のフローを図 3-1-1 に示す。

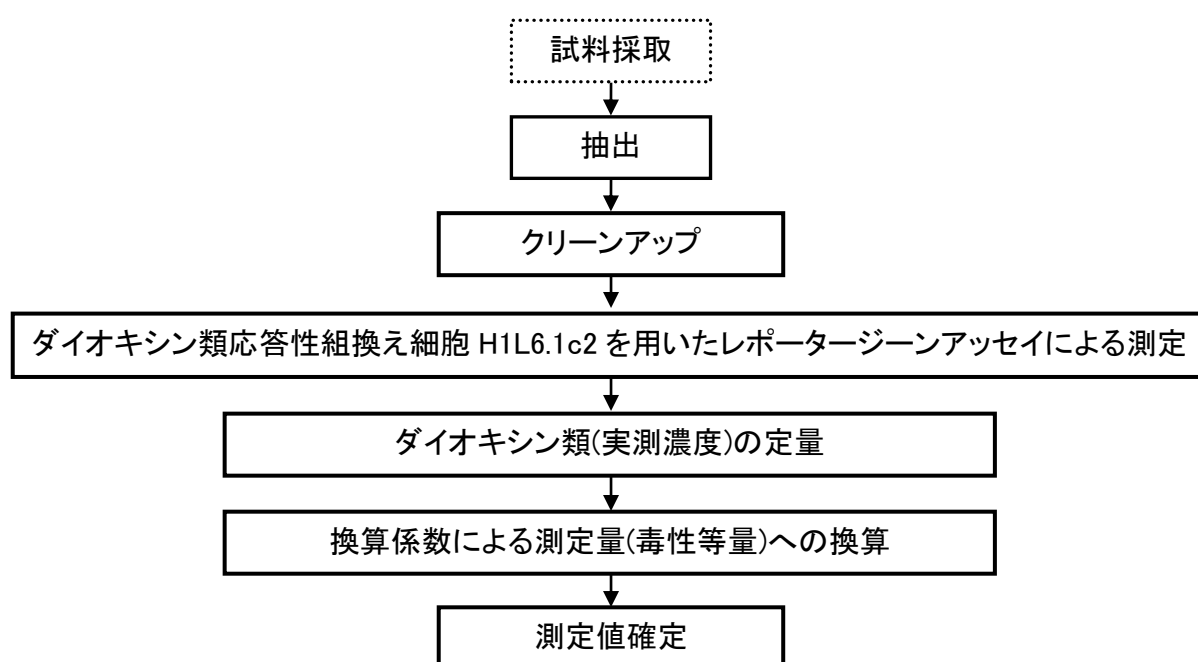



図 3-1-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **細胞株**　Cell Line、培養により増殖できる植物や動物起源の細胞集団
2) **遺伝子組み換え細胞**　組換え DNA 技術を用いて作製された細胞
3) **組換え DNA 技術**　組換え DNA を作製し、それを生細胞(宿主)に移入し、増殖させる技術
4) **外来遺伝子**　Exogenous Gene、遺伝子工学的手法等により外部から細胞内に導入された遺伝子
5) **ルシフェラーゼ遺伝子**　Luciferase Gene。生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子
6) **DRE**　Dioxin Responsive Element。ダイオキシン応答配列、ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分。
7) **ベクター**　Vector、組換え DNA 技術において、目的とする遺伝子を宿主細胞に運ぶ自己複製 DNA 分子

8) リガンド Ligand。タンパク質又は他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。受容体が鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応が引き起こされる。

9) Ah 受容体 Arylhydrocarbon Receptor。アリール炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。

10) 遺伝子転写 Gene Transcription、ポリメラーゼという酵素により、DNA の一方の鎖から相補的な配列を持つ RNA をコピーすること

11) CYP1A1 Cytochrome P450、薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、ダイオキシン類により誘導されることが知られている。

12) 継代培養 Subculture。保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの。

13) コンフルエント Confluent。培養細胞の密集生育状態。

14) プラスミド Plasmid。小型の環状 DNA 分子のこと。

15) 発光基質 生物発光反応の基質。

16) 精度プロファイル 精度確認用の標準溶液濃度と変動係数(CV%)との関連図。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V ： 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg/mL, 反応溶液中)　6.1 の 2)検出下限及び定量範囲の算出例の通りに精度プロファイルより求められた検出下限の標準物質濃度

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数　6.1 の 2)検出下限及び定量範囲の算出例の通りに精度プロファイルより求められた検出下限の標準物質濃度

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

C_{DL} ： 必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m^3N)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 5ng-TEQ/m³N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は0.17ng-TEQ/m³N)

抽出液を 50mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 4mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質による検出下限値は 0.977pg/ml、排出ガスの測定量への換算係数は 0.221 を用いた。

$$V = \frac{0.977 \times 0.4 \times 0.221 \times 4}{1000} \times \frac{50}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.010$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W　：　測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL}　：　標準物質における検出下限(pg/mL, 反応溶液中)　6.1 の 2)検出下限及び定量範囲の算出例の通りに精度プロファイルより求められた検出下限の標準物質濃度

k　：　測定量(毒性等量)への換算係数

v　：　測定用試料の液量(mL)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：　必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 50mL に定容し、その抽出液から 25mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 4mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限値は 0.977pg/ml、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数は 0.318 を用いた。

$$W = \frac{0.977 \times 0.4 \times 0.318 \times 4}{1000} \times \frac{50}{25} \times \frac{1}{0.10} = 0.0099$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-1-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

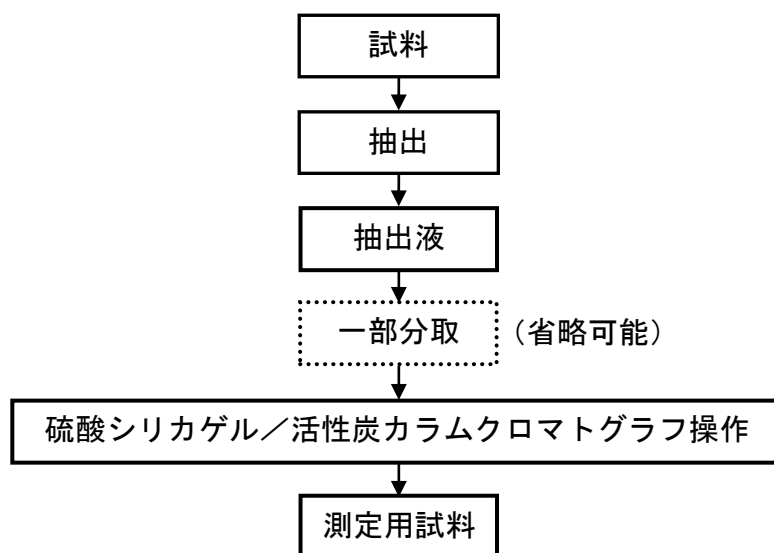



図 3-1-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　水　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの

2)　メタノール　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの

3)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの

4)　トルエン　JIS K 8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの

5)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの

6)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの

7)　酢酸エチル　JIS K8361 に規定するもの、又は同等の品質のもの

8)　ノナン　測定に支障のない品質のもの

9)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの

10)　セライト 545　測定に支障のない品質のもの

11)　塩酸　JIS K8180 に規定する特級、又は同等の品質のもの

12)　硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの

13)　ヘキサン洗浄水　1)の水を 6)のヘキサンで十分洗浄したもの

14)　シリカゲル　カラムクロマト用シリカゲル(粒径 70～230μm)をビーカーに入れて 180℃で約 48 時間

加熱した後、デシケーター中で約 30 分間放冷する。調製後、密栓できる試薬瓶に入れ、デシケーター中で保存する

15) 硫酸(33.3%質量分率)シリカゲル 14)のシリカゲル 100g に対して 12)の硫酸 50.0g を添加後、十分振とうし、粉末状にする。調製後、密栓できる試薬瓶に入れデシケーター中に保存する

16) XCARB 活性炭を分散させたセライト(XCARB/セライト(1%質量分率)、又は同等の品質のもの)

17) ガラス繊維ろ紙 孔径 0.5μm 程度のもの、ブフナー漏斗に用いる

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器、ロータリーエバポレータ又は遠心エバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフ管（小）

内径 7mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.5 硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフ管（大）

内径 13mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.6 活性炭カラムクロマトグラフ管

内径 6mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.7 漏斗

ブフナー漏斗又はこれと同等の品質のもの

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 3-1-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

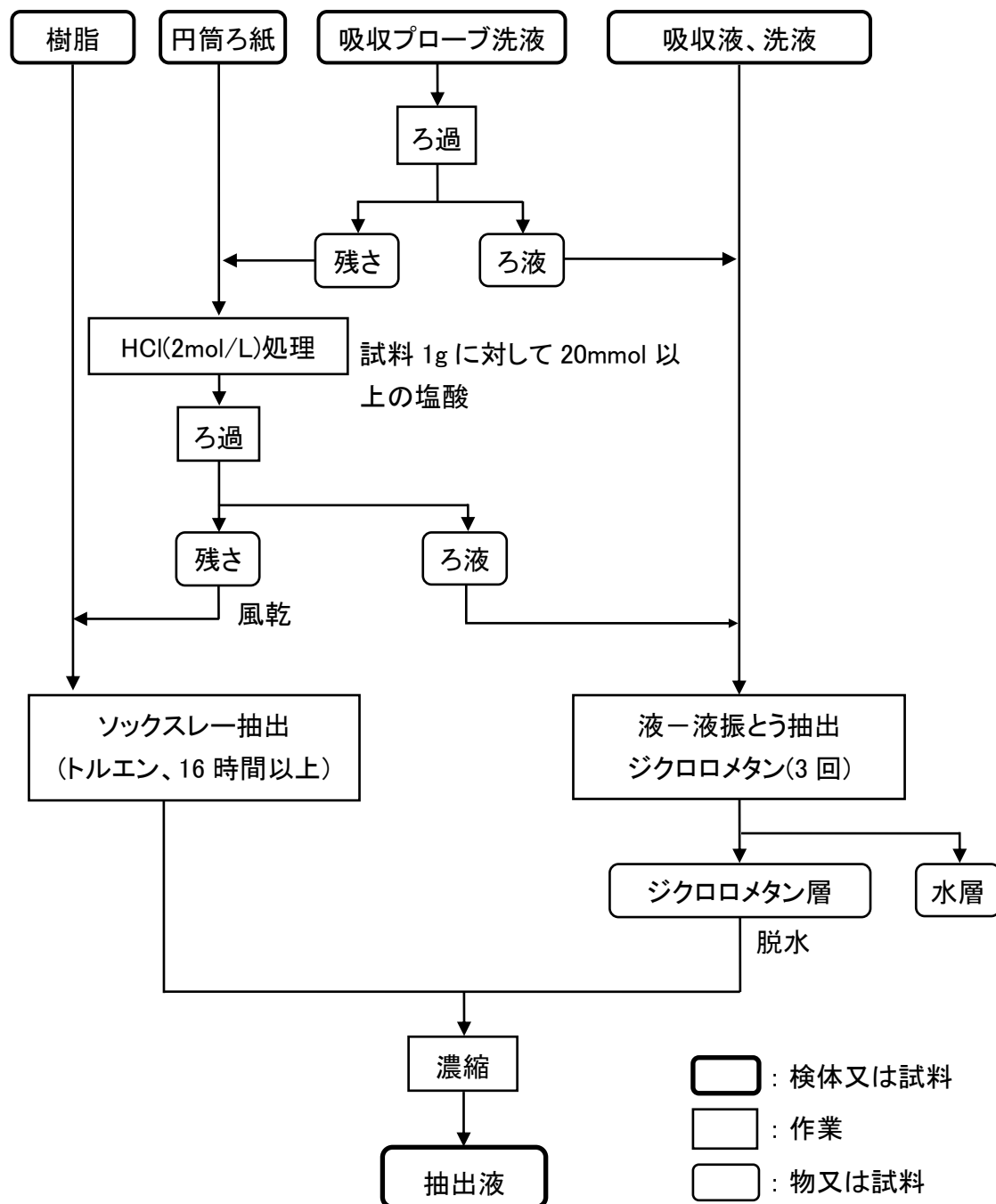



図 3-1-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。

試料の適量を用いて、ダイオキシン類分析及び水分測定を行う。図 3-1-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

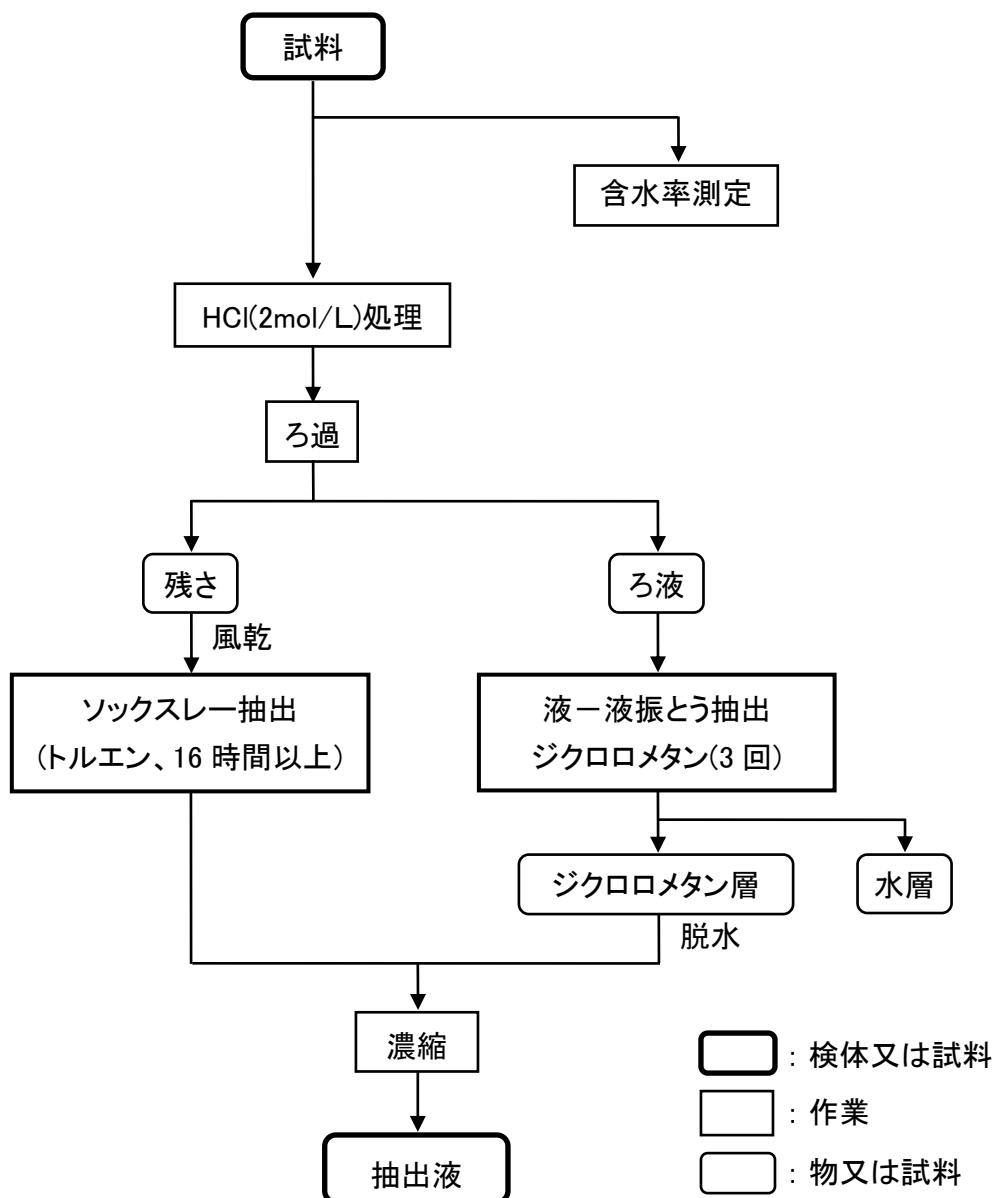



図 3-1-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

4.3　クリーンアップ

図 3-1-5 にクリーンアップのフローの例を示す(注 1)。

(注 1) 本クリーンアップの手法は、下記の特許によるもの
引用文献：M.Chu,et al.,Methods and apparatus for separating and detecting specific polyhalogenated diaromatic hydrocarbons,US Patent #6,720,431(2004)

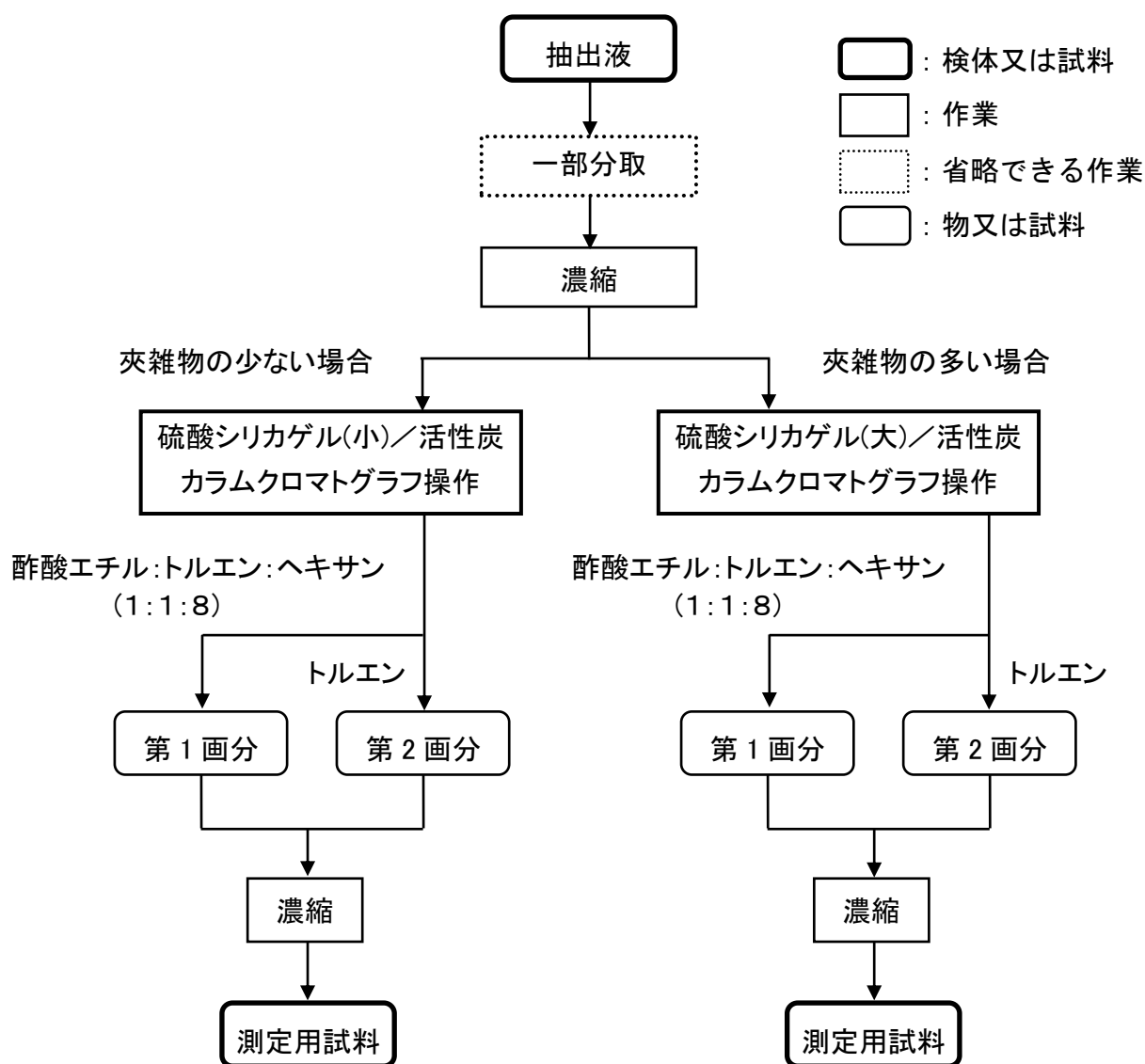



図 3-1-5　クリーンアップのフローの例

1) 抽出液の分取

(1) 抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。

(2) あらかじめ、ノナン 20μL を入れた受器に適量の抽出液を入れ、遠心エバポレータで乾固寸前まで濃縮し、この濃縮液を室温中でトルエンを除去する。その後、次に示す硫酸シリカゲル-活性炭カラムクロマトグラフ操作によってクリーンアップを行う。

2) 精製カラムの作製

(1) 硫酸シリカゲルカラム(小)

a) 3.4 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 1.7g、硫酸(33.3%質量分率)シリカゲル 3.0g、及び硫酸ナトリウム 1.7g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-6 に示す。

b) ヘキサン 30mL を流下させる。

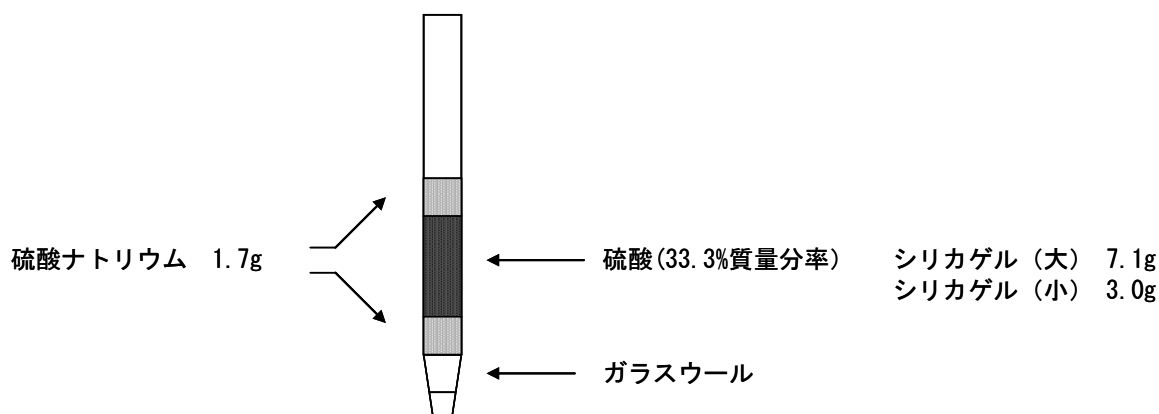



図 3-1-6　硫酸シリカゲルカラムの例

(2) 硫酸シリカゲルカラム(大)

a) 3.5 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 1.7g、硫酸(33.3%質量分率)シリカゲル 7.1g、及び硫酸ナトリウム 1.7g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-6 に示す。

b) ヘキサン 50mL を流下させる。

(3) 活性炭カラム(注 2)

a) 3.6 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 0.5g、1%XCARB/セライト 0.3g(注 3)、及び硫酸ナトリウム 1.0g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-7 に示す。

b) アセトン 5mL、トルエン 20mL、ヘキサン 10mL を流下させる。

(注 2) 活性炭は製造ロットによって、品質変動が考えられるため、内標準物質(クリーンアップスパイク)を用いて、ロットが変わるたび、添加回収を HRGC/HRMS 法により確認しておくことが望ましい。
(注 3) 定規を使用し 1%XCARB/セライト層が 3cm の厚みになっていることを確認する。厚みが 3cm に満たない場合、3cm になるよう調整する。

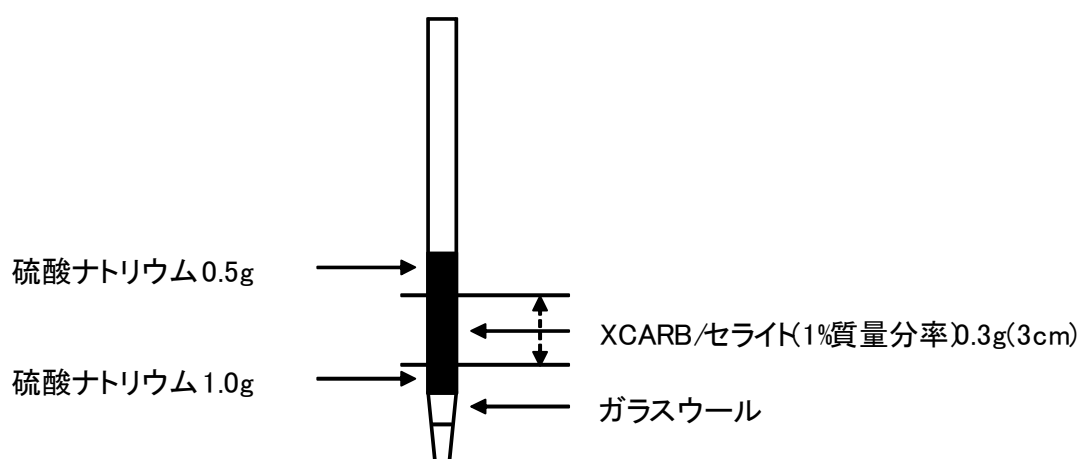



図 3-1-7　活性炭カラムの例

3) 硫酸シリカゲル(小)-活性炭カラムクロマトグラフ操作(夾雑物の少ない場合)

(1) 上部に硫酸シリカゲルカラム(小)と下部に活性炭カラムを連結させる。

(2) 濃縮液に、ヘキサン 2mL を加え、超音波照射後、カラムに静かに注ぎ入れる。

(3) ヘキサン 2mL で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(4) ヘキサン 1mL で同様の操作を行う。

(5) ヘキサン 10mL を流下させる。

(6) 硫酸シリカゲルカラムを外す。

(7) 活性炭カラムにヘキサン 10mL を流下させ、活性炭カラムを洗浄する。

(8) PCBs 溶出液(酢酸エチル/トルエン/ヘキサン(10%/10%/80%体積分率)15mL を流下させる(コプラナーPCBs 画分)。

(9) トルエン 20mL を流下させる(PCDDs 及び PCDFs 画分)。

(10) (8)および(9)画分（コプラナーPCBs 画分＋PCDDs 及び PCDFs 画分）を混合液として測定に供する。

4) 硫酸シリカゲル(大)−活性炭カラムクロマトグラフ操作(夾雑物の多い場合)(注 4)

(1) 濃縮液に、ヘキサン 5mL を加え、超音波照射後、硫酸シリカゲルカラム(大)に静かに注ぎ入れる。

(2) ヘキサン 3mL で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(3) ヘキサン 2mL で同様の操作を行う。ヘキサン 25mL を流下させる。

(4) 遠心エバポレータでヘキサン 2mL まで濃縮する。

(5) 濃縮液を、活性炭カラムに静かに注ぎ入れる。

(6) ヘキサン 2mL で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(7) ヘキサン 1mL で同様の操作を行う。

(8) ヘキサン 10mL を流下させ、活性炭カラムを洗浄する。

(9) PCBs 溶出液(酢酸エチル/トルエン/ヘキサン(10%/10%/80%体積分率)15mL を流下させる(コプラナーPCBs 画分)。

(10) トルエン 20mL を流下させる(PCDDs 及び PCDFs 画分)。

(11) (9)および(10)画分（コプラナーPCBs 画分＋PCDDs 及び PCDFs 画分）を混合液として測定に供する。

(注４) シリカゲル(大)-活性炭カラムクロマトグラフ操作を行なう目安としては、硫酸シリカゲル(小)で処理した場合に黄色もしくは、黒色のバンドが下部の硫酸ナトリウム層まで達した場合とする。この場合は、抽出液の分取からやり直し、硫酸シリカゲル(大)での処理を行う。

5) 測定用試料の保存

(1) 3)又は 4)の操作によって得られた溶液(PCDDs 及び PCDFs＋コプラナーPCBs 混合液)は遠心エバポレータで溶媒が完全になくなるまで濃縮する。

(2) 濃縮液を乾固させた遠沈管にヘキサン 4mL を加える。

(3) 遠沈管を 10 分間超音波照射する。

(4) 遠沈管の内壁を 2、3 回洗いながら、ヘキサンを 4mL 容のバイアル瓶へ移す。

(5) バイアル保管用の容器に入れ、冷蔵庫(5℃)で保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光量を発光光度計で測定することによりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の発光量から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2：レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、その上流域にダイオキシン応答配列 DRE を 4 個持つマウスのシトクロム P450(CYP1A1)プロモーターを配置したプラスミド pGudLuc6.1 を、マウス肝がん由来細胞 Hepa-1c1c7 に導入したもの(注５)。

(注５）引用文献 1：M.S.Denison,et al.,Bioassay for detecting 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin and TCDD-like compounds and novel recombinant cell line useful therefor,US Patent#5,854,010(1998),引用文献 2：Dalhp Han,Scott R.Nagy and Michael S Denison,Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists,BioFactors 20(2004)11-22

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1) **培地(RPMI1640 培地、FBS(+8%体積分率)、ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液(+1%体積分率))**
   2)を 500mL に 3)を 5mL、4)を 44mL 混合したもの
2) **RPMI1640 with L-Glutamine**
3) **ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液**　5000units/mL ペニシリン・5mg/mL ストレプトマイシン、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、0℃以下凍結保存
4) **Fetal Bovine Serum(FBS)**　56℃、30 分間非働化処理済、-20℃凍結保存
5) **トリプシン溶液**　0.25%、0℃以下凍結保存
6) **リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))**　マグネシウム及びカルシウム不含
7) **ジメチルスルホキシド(DMSO)**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 7)
8) **細胞凍結用保存液**　培地 34mL に DMSO 6mL 加え、シリンジフィルタ(孔径 0.2μm)を用い、ろ過滅菌を行ったもの
9) **標準物質(1)**　2,3,7,8-TeCDD(50μg/mL Toluene)
10) **保管用標準液(1-1)(Conc. TeCDD 5μg/mL DMSO)**　9)の標準物質を DMSO で 10 倍希釈する
11) **保管用標準液(1-2)(internal TeCDD 250ng/mL DMSO)**　10)の保管用標準液(1-1)を DMSO で 20 倍希釈する
12) **検量線作成用標準液(2,3,7,8-TeCDD DMSO 溶液)**　11)の保管用標準液(1-2)を DMSO で希釈して調製する(表 3-1-1)

13) 標準物質(2)　PCDDs/PCDFs 混合溶液(4111ng-TEQ/mL nonane)

14) 保管用標準液(2-1) PCDDs/PCDFs 混合溶液(180ng-TEQ/mL DMSO)　13)の標準液を DMSO に転溶し、 DMSO で 22.8 倍する

15) Quality Control PCDDs 及び PCDFs 混合溶液(QC 溶液)(0.250ng-TEQ/mL DMSO)　14)の保管用標準液(2-1)を DMSO で 720 倍希釈する(表 3-1-2)

16) ルシフェラーゼ定量キット

17) 細胞溶解液(Cell culture lysis reagent(×5 solution))　Cell culture lysis reagent(×5 solution)2mL に、水 8mL を加え調製する

18) 水　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等な品質のもの

19) ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの

20) 炭酸ガス　CO_2 99.99%

21) 液体窒素

(注 7) ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

表 3-1-1　検量線作成用標準液の調製例

標準物質(1)	濃度(ng/mL)　(有効数字 3 桁表記)									
	STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9
2,3,7,8-TeCDD	25.0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.781	0.391	0.195	0.0997	0.0488

表 3-1-2　QC 溶液の調製例

標準物質	濃度(ng/mL)		
	標準物質(2)	保管用標準液(2-1)	QC 溶液
2,3,7,8-TeCDD 1,2,3,7,8-PeCDD	1000	44	0.061
1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2000	88	0.12
OCDD	5000	219	0.30
2,3,7,8-TeCDF 1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,4,7,8-PeCDF	1000	44	0.061
1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	2000	88	0.12
OCDF	5000	219	0.30
Total PCDD/Fs(ng-TEQ/mL)	3893	171	0.237

2.3　器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1) **ルミノメーター**

2) **インキュベーター**　室温＋5℃～50℃、飽和湿度、5% CO_2 濃度

3) **遠心分離機**　回転数 3000～4000 min^{-1} が得られるもの

4) **安全キャビネット**　クラスⅡタイプ A

5) **液体窒素容器**

6) **システム顕微鏡**

7) **培養顕微鏡**

8) **恒温槽**

9) **高圧蒸気滅菌器**　JIS T7322 又は JIS T7324 に規定するもので 121℃以上に加熱でき、196kPa の器内圧力で使用できるもの

10) **乾熱滅菌器**　160～200℃に調節できるもの

11) **バキュームポンプ**

12) **ミキサー**

13) **遠心エバポレータ**

14) **パスツールピペット**　ガラス製、ピペット滅菌箱に入れ、乾熱滅菌をしておく

15) **10mL プラスチックピペット**　ポリスチレン製、使い捨てできるもの

16) **プラスチックチューブ**　10mL、50mL、ポリプロピレン製、使い捨てできるもの

17) **培養フラスコ**　25cm^2、75cm^2、150cm^2、ポリプロピレン製

18) **チップ**　20µL 用、200µL 用、1000µL 用、オートクレーブ可能なもの、ポリプロピレン製、高圧蒸気滅菌を行う

19) **連続分注ピペットチップ**　10mL

20) **96 ウェルクリアボトムプレートル（マイクロプレート）**　96well Flat Bottom、ポリスチレン製、白色プレート、細胞培養表面処理、滅菌済み

21) **バッキングテープ**

22) **凍結保存用バイアル**

23) **25mm シリンジフィルタ**　孔径 0.2µm、滅菌済み

24) **13mm ガラス試験管**　13×100mm 直口フリントガラスチューブ

25) **マイクロピペット**　20µL、200µL、1000µL

26) **8 連ピペット**

27) **連続分注ピペット**

28) **血球計算盤(改良型ノイバウエル血球計算盤、ブライトライン)**

29) **プレートシェーカー**

2.4　器具等の滅菌操作

器具等の滅菌操作は、次の通り行う。

1) **乾熱滅菌**　ガラス製及び金属製器具類の滅菌に用いる。約 170℃で約 1 時間滅菌する。

2) **高圧蒸気滅菌**　使用済み培地等の滅菌に用いる。121℃で約 30 分間滅菌する。

2.5　消毒操作

消毒操作は、次の通り行う。

1) 試験操作の前後には、手指及び実験台、キャビネットを消毒する。消毒用エタノール(エタノール(70% 体積分率))を用いる。

2) 使用済みのパスツール、吸引瓶、培地は、次亜塩素酸(10%)で消毒する。

2.6　吸引操作

吸引操作は、次の通り行う。

1) 安全キャビネット内で、バキュームポンプに接続しているチューブに滅菌済のパスツールピペットをつなぎ、バキュームポンプのスイッチを入れる。

2) 作業終了後は、2.5 の 2)の消毒操作を行う。

3．細胞の取り扱い

3.1　培養細胞の起眠

1) 液体窒素保存容器(凍結保存用バイアル)から取り出し融解後、培養フラスコ(25cm²)にて培養

(1) 液体窒素保存容器から凍結保存用バイアルを取り出す。

(2) 培地 1mL をマイクロピペットで凍結保存用バイアルに移し、ピペッティングにより凍結保存用バイアル内の氷を溶かす。溶けたものはプラスチックチューブ(15mL)に移す。これらの動作を数回繰り返す。(注 8)

(3) 凍結保存用バイアル内の培地を全部移したプラスチックチューブ(15mL)を 500rpm、10min 遠心分離する。

(4) パスツールピペットを使用して、プラスチックチューブより培地を吸引除去する。(注 8)

(5) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブに 10mL プラスチックチューブを用いて培地 5mL を加え、ピペッティングにより細胞のペレットを懸濁する。(注 8)

(6) 培養フラスコ(25cm²)に細胞懸濁液を全量移し、培養フラスコを数回傾けてなじませる。(注 8)

(7) インキュベーターにフラスコを入れ、CO_2 5%、37℃の環境下で培養する。

2) 培養フラスコ(25cm²)から播種し、培養フラスコ(75cm² 又は 150cm²)へ継代培養を行う。

翌日より毎日細胞の増殖状況を観察し､コンフルエントになったのが確認できたら､培養フラスコ(25cm²)をインキュベーターから取り出し、中の培地が濁っていないか目視で確認し、培養顕微鏡で細胞状態を確認する。

空の培養フラスコ(75cm² 又は 150cm²)を用意し、3.2 及び 3.3 の操作を行う（注 8)(注 9)。

(注 8) 安全キャビネット内で無菌操作を行う。

(注 9) 中の培地が濁っていたり、細胞が接着面より剥がれている場合、雑菌汚染を起こしているため、同じ培養系列の細胞を破棄して新しく冷凍細胞を起こして培養したものを使用する。

3) 特記事項

(1) 液体窒素保存容器(凍結保存用バイアル)から立ち上げて、150cm² でコンフルエントになった状態（約 1 週間）から試験に使用可能な細胞とする。

(2) 試験に使用できる期限としては、40～50 代までを目安とし、期限前であっても、測定をする際に問題があった場合は、原因を追及し、細胞の使用期限であると考えられた場合は、直ちに破棄する。

(3) 停電時には、細胞をインキュベーター内で保管し、温度及び CO_2 の低下を極力抑えるため、解放しない。使用する際には、細胞の状況確認し、問題なければ、測定し、問題があれば、直ちに破棄する。

3.2　細胞の回収

1) 培養フラスコ(150cm²)(注 10)をインキュベーターから取り出し、中の培地が濁っていないか目視で確認し、培養顕微鏡で細胞状態を確認する。培養フラスコの容量と試薬の分注量の一覧を表 3-1-3 に示した。

2) パスツールピペットを用いて培養フラスコから培地を完全に吸引除去する。(注 8)

3) プラスチックピペット(10mL)で PBS(-)を 5mL 加え、培養フラスコ壁面の洗浄を行い、パスツールピペットで PBS を吸引除去する。(注 8)

4) プラスチックピペットで、トリプシン溶液を 2mL 加え、細胞接着面になじませる。(注 8)

5) 1 分程度培養フラスコを寝かせて静置し、細胞が浮き上がってきたら、手のひらの付け根で培養フラスコの側面をたたいて細胞を剥がす。(注 8)

6) プラスチックピペットで培地を 10mL 加え、フラスコの壁面を洗いながら注ぎ込む。(注 8)

7) プラスチックピペットで、培養フラスコ中の培地を吸い取り、プラスチックチューブに移し、500rpm、10 分間遠心分離する。

8) 細胞を吸い取った培養フラスコは、プラスチックピペットで PBS(-)を 10mL 加え、壁面の洗浄を行い、パスツールピペットで PBS(-)を吸引除去する。(注 8)

9) 培養フラスコをすぐに使用しない場合は、冷蔵庫で保管する。

(注 10) 培養フラスコの種類は、この限りではない。面積により試薬の注入量を変更すればよい。

表 3-1-3　培養フラスコの容量と試薬の分注量の一覧(回収時)

培養フラスコ(cm²)	PBS(-) (mL)	トリプシン溶液 (mL)	培地(mL)	PBS(-) (mL)
150	5	2	10	10
75	2	1	5	5
25	1	0.5	2	2

3.3　細胞の継代

1) インキュベーターから培養フラスコ(150cm²)(注 11)を取り出し、3.2 の回収操作を行う(注 8)。

2) 空の培養フラスコ(150cm²)にあらかじめ培地 19mL を入れておく(注 8)。

3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブ(50mL)に細胞懸濁液を加える。加える培地の量は、希釈倍率に応じて変わるため、回収した培養フラスコ 1 枚分の細胞につき表 3-1-3 のようになる(注 8) (注 12)。

4) プラスチックピペットで 10 回程度ピペッティングし再懸濁し、細胞懸濁液 1mL を接種用に用意した培養フラスコに接種する(注 8)。

5) 培養フラスコを穏やかに数回傾け、培地中の細胞が均一になるようになじませる(注 8)。

6) インキュベーターにフラスコを入れ、5%CO_2、37℃の環境下で培養する。

(注 11) 培養フラスコの面積は、この限りではない。面積により試薬の注入量を変更すればよい(表 3-1-4 参照)

(注 12) 細胞の希釈率の決定：試験使用細胞株は、24 時間でほぼ 2 倍に増殖する。したがって、細胞を回収、使用したい日にコンフルエントなフラスコ(フラスコ底面を細胞が 80%以上覆っている状態のもの)を手に入れるためには、以下の希釈倍率を用いればよい。コンフルエントなフラスコ 1 個から細胞を回収し、n 日後にコンフルエントな同等のフラスコ 1 個が欲しいとき、希釈率は、1:2n(n=1～3)で表すことができる。また、コンフルエントなフラスコ A 個から接種用のフラスコに 1：B の希釈率で接種するとき、回収した細胞を新しい培地(A×B)mL で再懸濁し播種用のフラスコに 1mL 播種する。

表 3-1-4　フラスコ容量と試薬の分注量の一覧(継代時)

培養フラスコ (cm^2)	培地（mL)	希釈倍率	細胞懸濁液 (mL) (注 13)
150	19	1:2	2
		1:4	4
		1:8	8
75	9	1:2	2
		1:4	4
		1:8	8

(注 13) 細胞懸濁液は、細胞のペレットを再懸濁させる時に使用する培地の液量(mL)のことで、所定の培地で懸濁後、細胞懸濁液 1mL を接種し、培養フラスコ播種する場合を想定した分注量となる。

3.4　細胞の保存

1) インキュベーターから培養フラスコ(150cm^2)を取り出し、3.2 の回収操作を行なう(注 8)。
2) パスツールピペットを使用し、プラスチックチューブ(50mL)より培地を吸引除去する(注 8)。
3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブにプラスチックピペット(10mL)を用いて、(20mL×播種したフラスコ数)の培地を加え、ピペッティングにより細胞のペレットで懸濁液を作成する(注 8)。
4) 4.1 の細胞数の計測に従い、細胞濃度を 0.4×10^{6}cells/mL～1.2×10^{6}cells/mL となるように、培地を加え、プラスチックチューブを上下にしてよく混合する(注 8)。
5) 細胞懸濁液と細胞凍結用保存液を 1：1 の割合で混合する(注 8)。
6) マイクロピペット(1000µL)を用いて、1.5mL ずつ凍結保存用バイアルに分注する(注 8)。
7) 発泡スチロールの容器に入れ、－20℃で 4 時間保存する。
8) －80℃で一晩保存する。
9) 液体窒素保存容器へ移し保管する。

4．測定操作

4.1　細胞のマイクロプレートへの播種

1) インキュベーターから培養フラスコ(150cm^2)を取り出し、3.2 の操作を行なう(注 8)。目安として、およそ培養フラスコ 1 枚からプレート 1 枚作成が可能である。
2) パスツールピペットを使用し、プラスチックチューブ(50mL)より培地を吸引除去する(注 8)。
3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブにプラスチックピペット(10mL)を用いて培地 20mL を加え、ピペッティングにより細胞のペレットの懸濁液を作成する(注 8)。
4) マイクロピペット(20µL)を用いて細胞懸濁液 15µL を血球計算盤に乗せ、システム顕微鏡(×100)で細胞数(1mL 当りの細胞数)を求める。
5) 下記の計算を行い(注 13)、最終濃度 7.5×10^5 cells/mL となるよう最終容量を求め、最小容量になるように培地で適宜、希釈調製を行う(注 8)。
6) 8 連ピペットを用いてマイクロプレートの各ウェルに細胞懸濁液を 200µL ずつ加えていく(注 8)。
7) インキュベーターにマイクロプレートを入れ CO_2 5%、37℃の環境下で 14～24 時間培養する。

(注 13) 細胞数の計測の仕方：計算時の細胞濃度(cells/mL)＝血球計算盤の 4×4 グリッドの細胞数の平均×10^4

$$最終容量(mL) = \frac{現在の容量(mL) \times 計算時の細胞濃度(cells / mL)}{7.5 \times 10^5 (cells / mL)}$$

4.2 曝露

4.2.1 希釈率決定曝露操作

1) 溶液の適量配分

(1) 測定用試料の分取

a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 2μL 分注する。

b) 測定用試料を 4mL バイアルより一部適量を分取する(注 14)。

(注 14) 希釈率決定曝露操作で適量とは、表 3-1-5 に示す分注量を指す。
希釈率は、4mL 精製液に対して、2 ウェルに必要な試料割合のことで、1:40 であれば、4mL の 1/40 量(100μL)が測定用試料の分注量である。今回、希釈倍率決定の際には、3 段階の希釈倍率を各 1 ウェルを用いて測定を行うため、希釈倍率 1:40 では、その半分(50μL)が適量となる。

表 3-1-5 希釈率と測定用試料の分注量の一覧

希釈率	測定用試料の分注量 (1 ウェル当たり)
1:40	50μL
1:400	5μL
1:4000	0.5μL

(2) 検量線作成用標準液及び QC 溶液の分取

a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4μL 分注する。

b) 9 段階に希釈された検量線作成用標準液及び QC 溶液を適所に 4μL ずつ加える。

(3) ネガティブコントロール(NC)の分取

a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4μL 分注する。

2) DMSO 置換及び培地混合操作

(1) ヘキサンを加え、測定用試料の試験管内液量を 0.5mL、検量線作成用標準液、QC 溶液及び NC の試験管内液量を 1mL になるようメスアップする。

(2) 遠心エバポレータに試験管を入れ 12 分間濃縮する。

(3) その後、2 分ごとに、ガラス試験管内のヘキサンの残量確認を行う。

(4) 濃縮が確認されれば、最後に 2 分間濃縮を行い、完全に揮発させる。

(5) 連続分注ピペットを使用し、測定用試料の 13mm ガラス試験管に培地を 200 μL、検量線作成用標準液、QC 溶液及び NC の試験管に培地を 400μL 加え、10 秒程ミキサーにかけ攪拌する。

3) 細胞への曝露

(1) 14～24 時間培養したマイクロプレートをインキュベーターから取り出す。

(2) マイクロプレートのデカンテーションを行い、培地を完全に取り除く。

(3) 培養顕微鏡で全てのウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常が見られたらプレートシートにチェックをしておく。

(4) 2)で得られた DMSO 置換溶液(測定用試料＋検量線作成用標準液及び QC 溶液＋NC をマイクロピペ

ットで、測定用試料 190µL を 1 ウェル、検量線作成用標準液及び QC 溶液＋NC を 190µL ずつ 2 つのウェルに分注する。プレートレイアウト例は、図 3-1-8 の通り。

(5) 37℃、CO_2 5%の環境下で、20～24 時間培養する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			希釈 1.1	希 釈 1.2	希釈 1.3	希釈 2.1	希釈 2.2	希釈 2.3	希釈 3.1	希釈 3.2	希釈 3.3	
B		NC	→〃	STD5	→〃	希釈 4.1	希釈 4.2	希釈 4.3	希釈 5.1	希釈 5.2	希釈 5.3	
C		NC	→〃	STD4	→〃	希釈 6.1	希釈 6.2	希釈 6.3	希釈 7.1	希釈 7.2	希釈 7.3	
D		STD9	→〃	STD3	→〃	希釈 8.1	希釈 8.2	希釈 8.3	希釈 9.1	希釈 9.2	希釈 9.3	
E		STD8	→〃	STD2	→〃	希釈 10.1	希釈 10.2	希釈 10.3	希釈 11.1	希釈 11.2	希釈 11.3	
F		STD7	→〃	STD1	→〃	希釈 12.1	希釈 12.2	希釈 12.3	希釈 13.1	希釈 13.2	希釈 13.3	
G		STD6	→〃	QC 溶液	→〃	希釈 14.1	希釈 14.2	希釈 14.3	希釈 15.1	希釈 15.2	希釈 15.3	
H			希釈 16.1	希 釈 16.2	希釈 16.3	希釈 17.1	希釈 17.2	希釈 17.3	希釈 18.1	希釈 18.2	希釈 18.3	

図 3-1-8　レイアウト例(希釈率決定)(注 15)

① 太枠：B2～G2、B3～G3、B4～G4 及び B5～G5 は、検量線作成用標準液、QC 溶液並びに NC に 2 ウェルごとに使用する

② それ以外のウェル：1 試料当り希釈率 3 段階の調製液を 1 ウェルずつ曝露する。

(注 15) 定量操作における希釈率の決定：定量範囲として、STD8：0.977～STD：31.2 pg/mL を設定する(詳細は 6.1 を参照)。定量範囲に入る希釈倍率を希釈倍率決定用の曝露試験にて、試料ごとに決定する。定量範囲より低い RLU を示した場合、希釈倍率を下げる。定量範囲より高い RLU を示した場合、希釈倍率を上げる。希釈倍率としては、1：4 が最高濃度となることに注意する。

4.2.2　定量曝露操作

1)　溶液の適量配分

(1)　測定用試料の分取

a)　13mm ガラス試験管に DMSO を 4µL 分注する。

b)　測定用試料を 4mL バイアルより一部適量を分取する(注 16)。

(注 16) 適量とは、希釈率決定曝露操作で得た情報を元に分取率を決定する。

(2)　検量線作成用標準液及び QC 溶液の分取

a)　9 段階に希釈された検量線作成用標準液及び QC 溶液を適所に 4µL ずつ加える。

(3)　NC の分取

a)　13mm ガラス試験管に DMSO を 4µL 分注する。

2)　DMSO 置換及び培地混合操作

(1)　ヘキサンを加え、全ての 13mm ガラス試験管中の液量を 1mL とする。

(2)　遠心エバポレータに 13mm ガラス試験管を入れ 12 分間濃縮する。

(3) その後、2 分ごとに、ガラス試験管内のヘキサンの残量確認を行う。

(4) 濃縮が確認されれば、最後に 2 分濃縮を行い、完全に揮発させる。

(5) 連続分注ピペットを使用し、各試験管に培地を 400µL 加え、10 秒程ミキサーにかけ攪拌する。

3) 細胞への曝露

(1) 14～24 時間培養したマイクロプレートをインキュベーターから取り出す。

(2) マイクロプレートのデカンテーションを行い、培地を完全に取り除く(注 8)。

(3) 培養顕微鏡で全ウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常が見られたら記録用紙にチェックをしておく。

(4) 2)で得られた DMSO 置換溶液(測定用試料＋検量線作成用標準液及び QC 溶液＋NC をマイクロピペットで、190µL ずつ 2 つのウェルに分注する(注 8)。プレートレイアウト例は、図 3-1-9 の通り。

(5) CO_2 5%、37℃の環境下で、20～24 時間培養する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		NC	→〃	STD5	→〃	試料 1.1	→〃	試料 4.1	→〃	試料 7.1	→〃	
C		NC	→〃	STD4	→〃	試料 1.2	→〃	試料 4.2	→〃	試料 7.2	→〃	
D		STD9	→〃	STD3	→〃	試料 2.1	→〃	試料 5.1	→〃	試料 8.1	→〃	
E		STD8	→〃	STD2	→〃	試料 2.2	→〃	試料 5.2	→〃	試料 8.2	→〃	
F		STD7	→〃	STD1	→〃	試料 3.1	→〃	試料 6.1	→〃	試料 9.1	→〃	
G		STD6	→〃	QC 溶液	→〃	試料 3.2	→〃	試料 6.2	→〃	試料 9.2	→〃	
H												

図 3-1-9　レイアウト例(定量)

① 中太枠：B2～G2、B3～G3、B4～G4、B5～G5 は、検量線作成用標準液、QC 溶液、NC に 2 ウェルごとに使用する。

② 太枠：1 試料当り 2 つの同じ希釈調製液をそれぞれ横方向の 2 ウェルごとに曝露する。

4.3　ルシフェラーゼ活性の測定

1) 細胞の溶解

(1) 20～24 時間培養したマイクロプレートをインキュベーターより取り出す。

(2) マイクロプレート内の培地をデカンテーションにより完全に取り除く。

(3) 8 連ピペットを用いて PBS を各ウェルに 50µL ずつ加え、洗浄する。

(4) マイクロプレート内の PBS をデカンテーションにより完全に取り除く。

(5) 顕微鏡で全てのウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常がみられたら、プレートシートにチェックをしておく。

(6) マイクロプレートの底にバッキングテープを貼る。

(7) 連続分注ピペットを用いて細胞溶解液を各ウェルに 30µL ずつ加える。

(8) プレートシェーカーにてマイクロプレートを 2 分間穏やかに振動させ混合する。

(9) 10 分間静置する。

2)　ルシフェラーゼ活性の測定(注 17)

(1)　インジェクターに発光基質溶液を充填する。

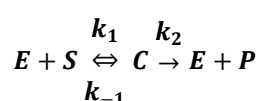
(2)　フタをはずした 96 穴プレートをセットし、ルシフェラーゼ活性を測定する。

(注 17) ルミノメーターの機器管理の一環として、毎日のセットアップ時にテストプレートを用いて、機器の発光の精度を確認することを薦める。

５．定量

5.1　検量線の作成

1)　本法のダイオキシン類の検出原理を記述する最も単純化した反応式は酵素反応式と同様の反応と考えて、下の通りに記述できる。

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}} C \overset{k_2}{\rightarrow} E + P$$

ここに、E　：酵素反応式における酵素(本法では Ah 受容体に該当)

S　：酵素反応式における基質(本法ではダイオキシン類に該当)

C　：酵素反応式における酵素－基質複合体(本法ではAh受容体-ダイオキシン類結 合体に該当)

P　：酵素反応式における反応生成物(本法ではルシフェラーゼに該当)

k　：反応速度定数

本生物検定法ではダイオキシン類(S)と Ah 受容体(E)との結合、そしてその結果、活性化されるルシフェラーゼ遺伝子により生成するルシフェラーゼ(P)を、上記の酵素反応式に適用している。

2)　酵素反応のモデル式には Hill の式を用いている。

Hill の式は最も単純な式である Michaelis-Menten の式

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} + b$$

ここに、 V　：　反応速度

V_{max}　：　最大反応速度

$[S]$　：　基質濃度

K_m　：　$V=1/2V_{max}$ の時の基質濃度

b　：　Intercept parameter（切片変数）

の$[S]$の代わりに$[S]^n$を適用したもので、薬理学で薬物濃度とそれによる臓器や組織の反応を表現するのによく使われている式である。

3)　検量線のモデル式には Hill の式を用いる。

$$V = \frac{V_{max} \times [S]^n}{[K_m]^n + [S]^n} + b$$

ここに、 V　：　薬理反応(ルシフェラーゼの生成濃度＝RLU)

V_{max}　：　最大薬理反応(ルシフェラーゼ最大生成量)

$[S]$　：　基質濃度(ダイオキシン類濃度)の自然対数値

K_m　：　V=1/2 V_{max} の時の基質濃度の自然対数値

n　：Hill's coefficient（Hill の係数）、Slope parameter（勾配変数）

b　：Intercept parameter（切片変数）

4) 検量線の係数を求める

2,3,7,8 - TeCDD 標準物質の添加により生じる細胞の RLU を測定し、モデル式でカーブフィットさせ、パラメーターを決定する。

10 段階のダイオキシン類濃度希釈列に対する RLU を測定し、理論式に代入し、表計算ソフト等を用いて、4 つのパラメーター、$Vmax$、Km、n、b の最適化(測定した RLU と理論式における RLU との偏差の 2 乗が最小になるようにする)を行う。検量線作成およびパラメータの例は、図 3-1-10 の通り。

標準物質量 (pg/well)	標準物質濃度 (pg/ml)	標準物質対数変換値	標準物質計測値
A	B= A/190*1000	C= LN(B*100)	RLU
23.75	**125**	9.43	**22880**
11.9	**62.5**	8.74	**19448**
5.94	**31.3**	8.05	**16471**
2.97	**15.6**	7.35	**12357**
1.48	**7.81**	6.66	**7517**
0.742	**3.91**	5.97	**4754**
0.371	**1.95**	5.27	**2114**
0.186	**0.977**	4.58	**1233**
0.0928	**0.488**	3.89	**434**

パラメーター			
V_{max} =	28631	n =	6.59
K_m =	7.75	b =	192

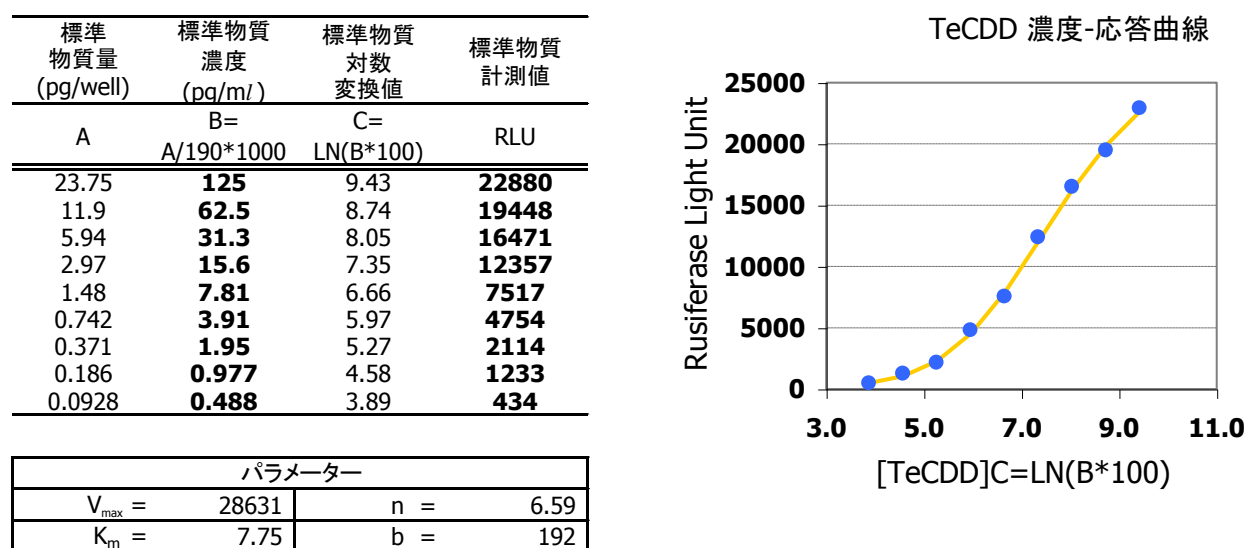



図 3-1-10　検量線作成及びパラメーターの例

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、検量線の確認及び感度変動の確認について、管理限界（μ±2σ）を用いて行う（μ:工程平均、σ:測定量（毒性等量）の標準偏差)。

STD5(TeCDD：0.78ppt)及び QC 溶液の測定値から、測定量（毒性等量）を求め、管理図に記録し保存する。管理図による処置基準は、管理限界（μ±2σ）からの逸脱状況に応じて下記の通りとする。

1点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

感度変動の管理図作成の例を次に説明する。STD5(TeCDD：0.78ppt)及び QC 溶液管理図例は、図 3-1-11 及び図 3-1-12 の通り。

1) 4．測定操作に従って、定量を行う。

2) STD5(TeCDD：0.78ppt)については、5.3 測定試料の定量に従って毒性等量を算出する。STD5(TeCDD：0.78ppt)の算出例は、表 3-1-6 の通り。

3) QC 溶液については、5.3 測定試料の定量に従って実測濃度を算出する。

4) QC 溶液の実測濃度に対して、PCDDs/PCDFs 混合標準液の換算係数(0.607)を乗じて、毒性等量を算出する。

測定値(毒性等量)（ng-TEQ/mL）＝実測濃度(ng/mL)×換算係数

QC 溶液(ng-TEQ/mL)＝0.53(pg/μL)×0.642＝0.35

QC 溶液の算出例 は、表 3-1-6 の通り。

表 3-1-6　STD5(TeCDD：0.78ppt)及び QC 溶液の算出例

QC 溶液（ng-TEQ/mL)＝0.53(pg/μL)×0.642＝0.35

STD5 TeCDD 0.78ppt	発光量 (RLU)	対数換算値	標準物質相当量 (pg/mL)	標準物質相当量 (pg/400μL)	希釈倍率	分取率 (%)	供試量 (μL)	測定量 (毒性等量) (pg-TEQ/μL)
	7815	6.64	7.68	3.07	1	100	4	0.77
QC 溶液	発光量 (RLU)	対数換算値	標準物質相当量 (pg/mL)	標準物質相当量 (pg/400μL)	希釈倍率	分取率 (%)	供試量 (μL)	測定量 (毒性等量) (pg-TEQ/μL)
	5923	6.28	5.34	2.14	1	100	4	0.53

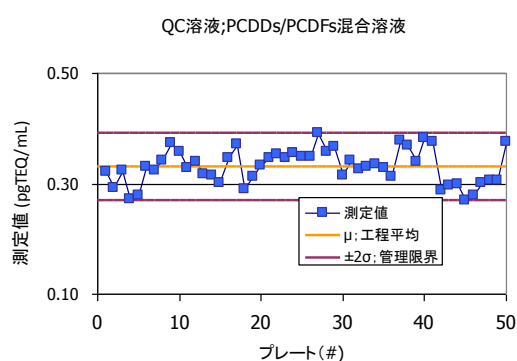



図 3-1-11 管理図例（QC 溶液）

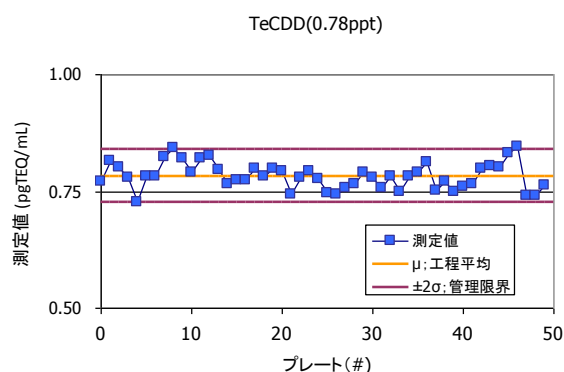



図 3-1-12 管理図例(TeCDD:0.78ppt)

5.3　測定試料の定量

実測濃度の算出方法の手順を以下に示す(注 19)。実測濃度の算出例は、表 3-1-7 の通り。

1) 定量範囲にある RLU から対数換算値の算出－Hill の式に検量線から求めた係数を当てはめる。なお、定量範囲については 6.1 の 2)で定義する。

$$k = \left(\frac{(RLU - b) \times {K_m}^n}{V_{max} - RLU + b}\right)^{\frac{1}{n}}$$

ここに、k：対数換算値

2) 実測濃度(pg/mL)の算出－対数換算値を乗数に換算する。

$$X = \frac{e^k}{100}$$

ここに、X　：測定試料中の実測濃度(pg/mL)

3) 試験管あたりの実測濃度(pg：試験管あたり 400μL 培地)

$$C_T = X \times 0.4$$

ここに、C_T ：試験管あたりの実測濃度(pg：400µL 培地)

X ：測定試料中の実測濃度(pg/mL)

4) 精製液中の実測濃度(pg：4mL 精製液)

$$C_C = C_T \times n$$

ここに、C_C ：精製液中の実測濃度(pg：4mL 精製液)

n ：希釈倍率

5) 抽出液中の実測濃度(pg：抽出液)

$$C_E = C_C \times \frac{V_E}{V'_E}$$

ここに、C_E ：抽出液中の実測濃度(pg：抽出液)

C_C ：精製液中の実測濃度(pg：4mL 精製液)

V_E ：抽出液量(mL)

V'_E: 抽出液分取量(mL)

6) 試料中の実測濃度(ng/m³N 又は ng/g)

$$C_S = \frac{C_E}{V} \times \frac{1}{1000}$$

ここに、C_S ：実測濃度(ng/m³N 又は ng/g)

V ：試料採取量(m³N 又は g)

(注 19) 解析例：1 試料につき、n=2 の試験管を用いて、DMSO 転溶し、培地に溶解後、1 試験管当たり 2 ウェルに分注する。1 試料当たり、2 ウェルの RLU の平均を n=2 で算出する。

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正は、次式によって行う。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C ： 酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m³N)

Os ： 排出ガス中の酸素の濃度(注 20)(%)

Cs ： 排出ガス中の実測濃度(ng/m³N)

(注 20) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os=20 とする。

表 3-1-7 実測濃度の算出例

発光量 (RLU)	対数 換算値	標準物質 相当量 (pg/mL)	標準物質 相当量 (pg/400µL)	希釈 倍率	分取率 (%)	試料 採取量 (m³N, g)	実測濃度 (ng/m³N,ng/g)
6570	6.41	6.08	2.43	100	20	6	0.405
5890	6.27	5.30	2.12	100	20	6	0.353

６．検出下限及び定量範囲

6.1　標準物質における検出下限及び定量範囲の確認

検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定量（毒性等量）の定量値の変動係数(CV%)が30%以下となる点を検出下限、20%以下となる上下2点間を定量範囲として算出し、結果を記録しておく。

1)　検出下限等算出用標準溶液の調製例

表 3-1-8 に示す濃度の検出下限等算出用標準溶液を調製する。

表 3-1-8　検出下限等算出用標準溶液の調製例

標準物質(1)	濃度(ng/mL)										
	STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9	STD10
2,3,7,8-TeCDD	25.0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.781	0.391	0.195	0.0997	0.0488	0.0244

2)　検出下限及び定量範囲の算出例

調製した検出下限等算出用標準溶液を n=5 で測定した検量線より定量し、測定量（毒性等量）の平均、標準偏差及び変動係数(CV%)を算出し、精度プロファイルを作図し、検出下限及び定量範囲を図より読み取る。検出下限及び定量範囲の確認のレイアウト例は、図 3-1-13 の通り。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		NC	→〃	→〃	→〃	→〃	STD5	→〃	→〃	→〃	→〃	
C		STD10	→〃	→〃	→〃	→〃	STD4	→〃	→〃	→〃	→〃	
D		STD9	→〃	→〃	→〃	→〃	STD3	→〃	→〃	→〃	→〃	
E		STD8	→〃	→〃	→〃	→〃	STD2	→〃	→〃	→〃	→〃	
F		STD7	→〃	→〃	→〃	→〃	STD1	→〃	→〃	→〃	→〃	
G		STD6	→〃	→〃	→〃	→〃	STD0	→〃	→〃	→〃	→〃	
H												

図 3−1−13　レイアウト例（検出下限及び定量範囲の確認）

検出下限及び定量範囲の算出例を表 3-1-9、図 3-1-14 に示す。

標準物質濃度(pg/ml)の定量値から得られた変動係数(n=5)から 30〜20%の地点を検出下限値（ここでは、0.977pg/ml）、20%以下の定量範囲で最小濃度を定量下限値（ここでは、1.95pg/ml）とした

表 3-1-9　測定結果例(n=5 測定)

検出下限：0.977(pg/mL)　定量範囲：1.95～62.5(pg/mL)

標準物質量(pg/well)	標準物質濃度(pg/m*l*)	標準物質対数変換値	標準物質計測値	標準物質濃度 (n=5)(pgTEQ/m*l*)				
A	B=A/190*1000	C=LN(B*100)	(RLU)	平均	標準偏差(σ)	変動係数(C.V.(%))	乖離度	
47.5	**250**	10.13	**24560**	**257**	173	*67.5*	1.03	
23.8	**125**	9.43	**23926**	**189**	106	*56.0*	1.51	
11.9	**62.5**	8.74	**19727**	**62.2**	11.6	*18.6*	1.00	↑ 定量範囲
5.94	**31.3**	8.05	**15002**	**31.0**	5.54	*17.9*	0.99	
2.97	**15.6**	7.35	**9696**	**15.5**	1.00	*6.43*	0.99	
1.48	**7.81**	6.66	**5195**	**7.82**	0.338	*4.33*	1.00	
0.742	**3.91**	5.97	**2597**	**4.17**	0.267	*6.39*	1.07	
0.371	**1.95**	5.27	**1328**	**2.30**	0.303	*13.1*	1.18	定量下限 ↓
0.186	**0.977**	4.58	**637**	**0.97**	0.260	*26.8*	0.99	検出下限
0.0928	**0.488**	3.89	**364**	**ND**	－	－	－	
0.0464	**0.244**	3.20	**271**	**ND**	－	－	－	

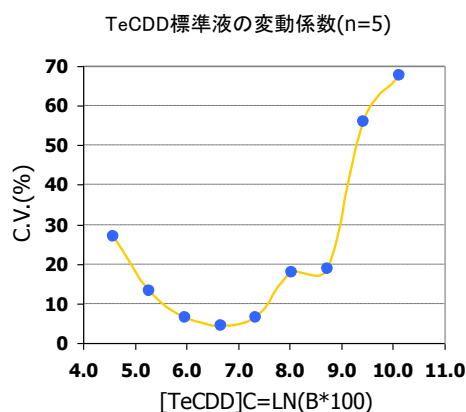



図 3-1-14　精度プロファイルの例

標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回十分な性能が得られていることを確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認する。

6.2　試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、反応液中の標準物質における検出下限及び定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

1)　試料ガス

試料ガスにおける検出下限及び定量下限は、下記の式により算出する。

$$C_{DL} = \frac{Q_{DL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V} \qquad C_{QL} = \frac{Q_{QL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、C_{DL}　：　試料ガスにおける検出下限(0℃、101.32kPa)(ng/m³)

C_{QL}　：　試料ガスにおける定量下限(0℃、101.32kPa)(ng/m³)

Q_{DL}　：　標準物質における検出下限(pg/mL, 反応溶液中)(例 0.977pg/mL)

Q_{QL}　：　標準物質における定量下限(pg/mL, 反応溶液中)(例 0.195pg/mL)

v　：　希釈倍率（測定用試料中からの分注量）（例 4、d=1mL）

4mL 容測定用試料の一部を分注する率＝4/d(d：測定用試料の液量(mL))

V_E　：　抽出液量(mL)(例 50mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)(例 10mL)

V ： 試料ガスの採取量(0℃、101.32 kPa)(例 $4m^3$)

k ： 補正係数＝0.221(排出ガス)

2) ばいじん及び燃え殻

ばいじん及び燃え殻試料における検出下限及び定量下限は、下記の式により算出する。

$$C_{DL} = \frac{Q_{DL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W} \qquad C_{QL} = \frac{Q_{QL} \times 0.4 \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W}$$

ここに、C_{DL} ： ばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng/g)

C_{QL} ： ばいじん及び燃え殻試料における定量下限(ng/g)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg/mL, 反応溶液中)(例 0.977pg/mL)

Q_{QL} ： 標準物質における定量下限(pg/mL, 反応溶液中)(例 1.95pg/mL)

v ： 希釈倍率(測定用試料中からの分注量)(例 4、d=1mL)

4mL 容測定用試料の一部を分注する率＝4/d(d：測定用試料の液量(mL))

V_E ： 抽出液量(mL)(例 50mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)(例 25mL)

W ： ばいじん及び燃え殻試料の採取量(g)(例 7g)

k ： 補正係数＝0.318(ばいじん及び燃え殻)

７．測定量（毒性等量）への換算

測定量(毒性等量)の算出方法を以下に示す。

本生物検定法における実測濃度は、2,3,7,8-TeCDD 検量線より求めた生物検定法独自の毒性評価値となる。従って HRGC/HRMS 法にて測定した毒性等量と比較するためには、換算が必要となる。

あらかじめ、多検体の HRGC/HRMS 法によって測定された試料について本生物検定法による測定を行い、両法における相関関係を求め、その回帰式の傾きを換算係数として、実測濃度から測定量(毒性等量)を算出する。

測定量(毒性等量)(ng-TEQ/g、ng-TEQ/m^3N)＝実測濃度(ng/g、ng/m^3N)×換算係数

なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第６節記載の換算係数と大きく乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼ

すサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成4年厚生省告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法4.1～4.3及び5.3に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

多数の排出ガス試料(この例では n=46。n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求め、HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-1-15 では Y/X の平均値である 0.221 を換算係数とした)。

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

多数のばいじん及び燃え殻試料(この例では n=94、n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-1-16 では Y/X の平均値である 0.318 を換算係数とした)。

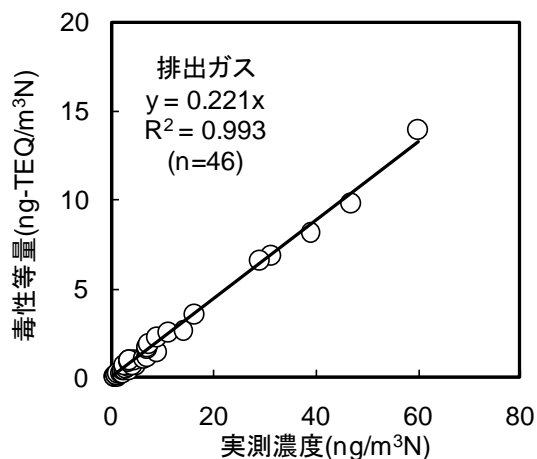



図 3-1-15　換算係数算出(例)
（排出ガス）

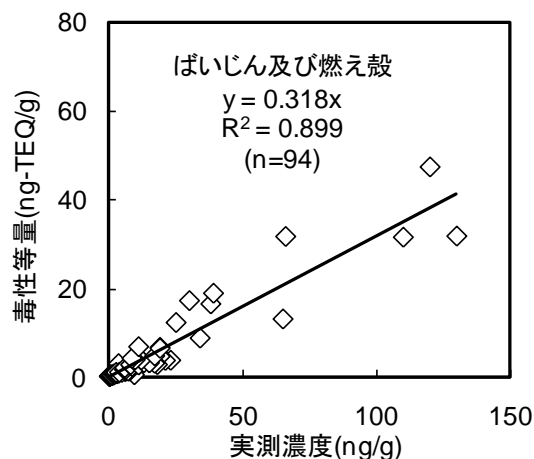



図 3-1-16　換算係数算出(例)
（ばいじん及び燃え殻）

その２　前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 2)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いたレポータージーンアッセイによる測定により定量する。測定方法のフローを図 3-2-1 に示す。

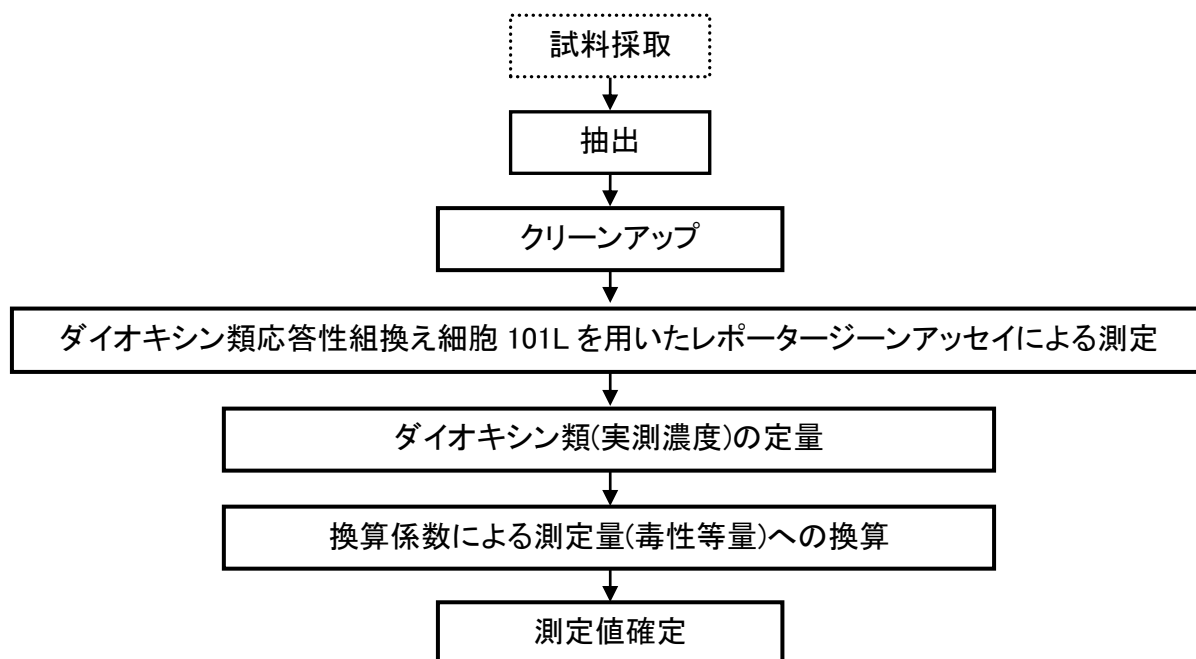



図 3-2-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **Ah 受容体**　Ah Receptor、Arylhydrocarbon Receptor。アリール炭化水素受容体。特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。
2) **リガンド**　Ligand。タンパク質又は他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。受容体が鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応が引き起こされる。
3) **ルシフェラーゼ遺伝子**　Luciferase Gene。生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子。
4) **CYP1A1**　Cytochrome P450。薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、ダイオキシン類により誘導されることが知られている。
5) **XRE**　Xenobiotics Responsive Element、生体異物応答配列。
6) **プラスミド**　Plasmid、小型の環状 DNA 分子のこと。

7) **継代培養**　Subculture。保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの。

8) **発光基質**　生物発光反応の基質。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

(例)5 ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17 ng-TEQ/m^3N

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V　：測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：必要となる試料ガスにおける検出下限（ng-TEQ/m^3N)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）抽出液を 20 mL に定容し、その抽出液から 10 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.08 mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限値は 300pg/mL、排出ガスの測定量への換算係数は 0.185 を用いた。

$$V = \frac{300 \times 0.185 \times 0.08}{1000} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.052$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下にばいじん及び燃え殻試料における検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W　：　測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL}　：　標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k　：　測定量(毒性等量)への換算係数

v　：　測定用試料の液量(mL)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：　必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4)　算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 3 ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1 ng-TEQ/g）

抽出液を 10 mL に定容し、その抽出液全量を用いてクリーンアップを行い、最終的に 0.2 mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限値は 300pg/mL、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数は 0.192 を用いた。

$$W = \frac{300 \times 0.192 \times 0.2}{1000} \times \frac{10}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.12$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-2-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

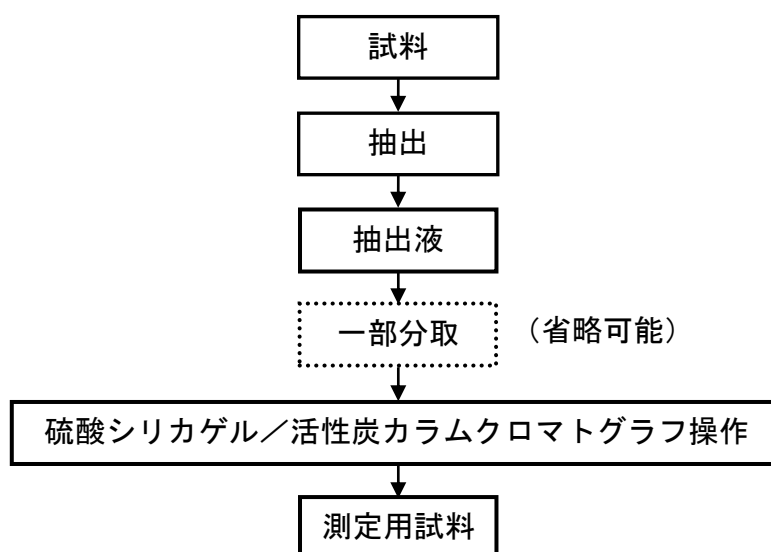



図 3-2-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、JIS K0311 若しくは平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に記載の試薬(ただし、内標準物質は使用しない) 又は同等の品質のもの、及び次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1) ジメチルスルホキシド(DMSO) JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)

2) ケイソウ土 バリアン社製ハイドロマトリックス、又は同等の品質のもの。

(注 1) ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2.1 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.2.2 高速溶媒抽出装置(ASE 抽出装置)

ダイオネクス製 ASE-300 又は同等品。ASE 用の器具一式(セルボディー、セルエンドキャップアセンブリ、溶媒ボトル、捕集ボトルアセンブリー、コンプレッサー等)

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 その他

JIS K0311 又は平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に記載のもの及び下記の器具、又はこれらと同等の品質のもの。

1) pH 試験紙 ばいじん等の pH 測定に使用

2) アルミロート ハイドロマトリックスの充填に使用

3) セルロースフィルター ϕ33 mm、ASE 抽出に使用

4) 固相抽出用チューブ 60 mL 用、フリット付、クリーンアップに使用

5) 固相抽出用チューブ 10 mL 用、クリーンアップに使用

6) フリット ϕ9 mm、クリーンアップに使用

7) ユニストッパー 4)と 5)の連結に使用、中央にϕ4 mm 程度の穴を開けたもの

8) カラムアタッチメント 50 mL プラスチックボトルのフタ中央にϕ4 mm 穴を開けたもの

9) KD 管 ϕ12 mm×L 92mm、クリーンアップ済み試料の DMSO 置換に使用

４．前処理操作

4.1　試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2　抽出

1)　排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 3-2-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

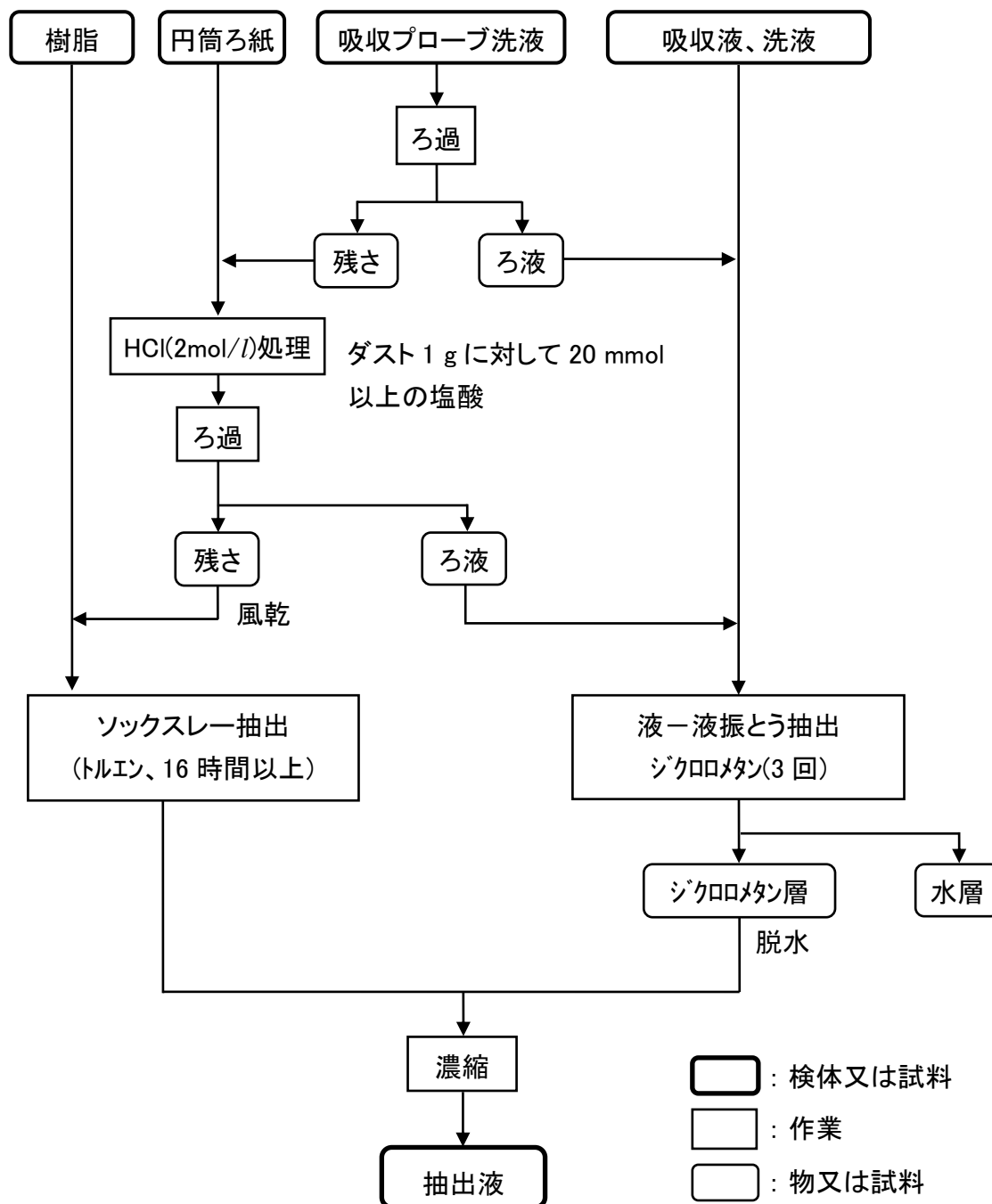



図 3-2-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。適量の試料を用いてダイオキシン類の測定及び含水率の測定を行う。

図 3-2-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

図 3-2-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

以下に、ASE 抽出装置を用いた方法を示す。

(1) 試料を適量の精製水中に入れて混和し、pH 試験紙で水層の pH を測定する。pH が 7 を超える場合は、塩酸処理を行う。pH が 7 以下の場合には塩酸処理を省略し、抽出操作に進む。

(2) 抽出操作を行う場合には損失のないように注意し、容器に残った試料を完全に拭き取りセル中に合わせる。

(3) ASE の抽出は下記の条件で行う。

サイクル数　:　2(1 サイクル目：アセトン、2 サイクル目：トルエン)
HEATING　:　9 分
STATIC　:　10 分
FLUSHING　:　50 %

PURGING　：　300 秒

温度　：　200 ℃

圧力　：　1500 psi

(4) アセトン抽出液を濃縮したもの及びトルエン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、合わせる。

(5) ナスフラスコをエバポレータ等の濃縮器にセットし抽出液を濃縮する。

(6) 濃縮液をヘキサンで 10 mL にメスアップする。

4.3　クリーンアップ

平成 4 年厚生省告示第 192 号に記載の方法、又は下記の方法によりクリーンアップを行う。図 3-2-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

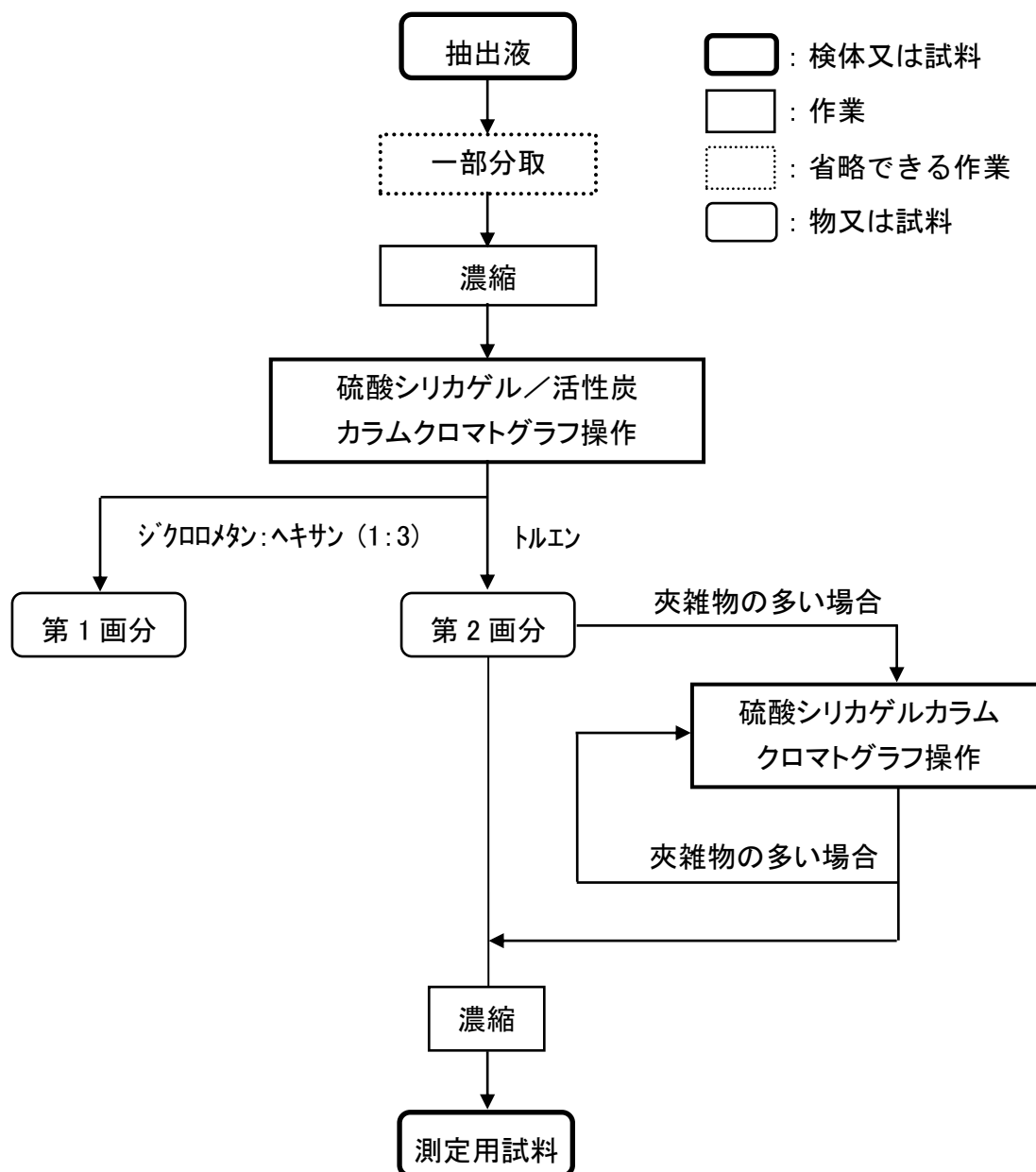



図 3-2-5　クリーンアップのフローの例

1)　抽出液の分取

抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。（通常、抽出液の 1/1～1/10 程度を用いる。高濃度であることが予想される場合には、より少量を分取してもよい。）

2)　精製カラムの作製(図 3-2-6)

(1) 硫酸シリカゲルカラム

60 mL 用固相抽出用チューブに下から乾式充填法で、脱脂綿適量、44 %硫酸シリカゲル 10±0.1 g、シリカゲル 1.8±0.1 g、無水硫酸ナトリウム 5～5.5 g、フリットの順に積層する。

(2) 活性炭カラム

12 mL 用固相抽出用チューブに下から乾式充填法で、フリット、活性炭埋蔵シリカゲル 0.5±0.02 g、無水硫酸ナトリウム 0.3±0.02 g、フリットの順に積層する。

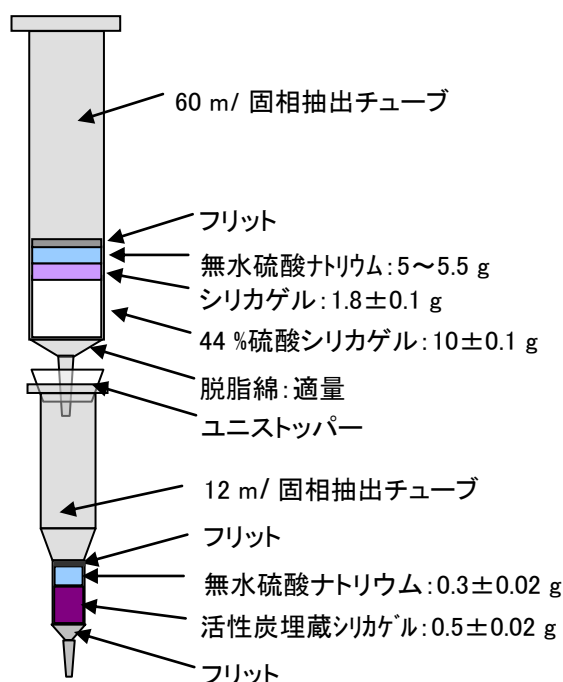



図 3-2-6　精製カラムの例

3)　クリーンアップ操作

(1) 硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムにヘキサンを 20 mL 流す。

(2) 活性炭カラムの上に硫酸カラムをセットし、ヘキサンを 10 mL 流す。

(3) ヘキサンが流れ終わってから、試料をカラムに添加する。ヘキサンで抽出液の入っていた容器を洗浄し、洗液をカラムに注入する。

(4) カラムにヘキサン 70 mL を流す。

(5) 硫酸シリカゲルカラムの層を観察し、破過した場合には(8)まで操作を行った後(10)へ。

(6) 硫酸シリカゲルカラムを外し、活性炭カラムの上に空の 60 mL 用固相抽出用チューブを接続し、ジクロロメタン：ヘキサン＝1：3 を 50 mL 流す。

(7) 活性炭カラムの下にナスフラスコをセットし、トルエン 70 mL で溶出する。

(8) ナスフラスコをロータリーエバポレータ等の濃縮器にセットし、トルエン層を 0.5 mL 程度まで濃縮

する。

(9) 濃縮液を KD 管に移す。ナスフラスコをヘキサンで洗い込みながら KD 管に移し約 3 mL にし 4)の溶媒置換の工程へ。

(10) 新しい硫酸シリカゲルを用意し、ヘキサン 30 mL を流す。

(11) 硫酸シリカゲルカラムの下に空のナスフラスコをセットする。

(12) 濃縮液をカラムに注入する。濃縮液の入っていたナスフラスコをヘキサンで洗い洗液をカラムに注入する。

(13) カラムにヘキサン 70 mL を流す。

(14) ナスフラスコをロータリーエバポレータ等の濃縮器にセットし、ヘキサン層を 0.5 mL 程度まで濃縮する。

(15) 硫酸シリカゲルカラムが破過していない場合は(9)、破過している場合は(10)の工程へ。

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3)で得られた試料(ヘキサン層)の入った KD 管を吹き付け装置にセットして 20μL まで濃縮し、着色や沈殿等の異常がないことを確認する。次に DMSO 20μL を添加し、20μL まで濃縮することにより DMSO に溶媒置換する。

(2) KD 管に DMSO を適量加え(排出ガス試料の場合 60μL、ばいじん等試料の場合 180μL。試料の濃度等により増減する場合もあり)、試験管ミキサー等でよく撹拌する。

(3) 試料をバイアルに移し、試料識別用のラベルを貼り、最終検液として室温で暗所に保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光量を発光光度計で測定することによりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の発光量から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L：レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、その上流域に生体異物応答配列 XRE を３個持つヒトのシトクロム P450（CYP1A1）プロモーターを配置したプラスミド pL1A1N を、ヒト肝がん細胞由来 HepG2 に導入したもの。

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1) 培地 イーグル MEM 炭酸水素ナトリウム含有、L-グルタミン不含、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、冷蔵保存

2) **FETAL BOVINE SERUM(FBS)**　56 ℃、30 分間非働化処理済、-20 ℃凍結保存

3) **L-グルタミン**　200 mM、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、0 ℃以下凍結保存

4) **ピルビン酸ナトリウム**　100 mM、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、冷蔵保存

5) **培養液**　1)の 500 mL、2)の 25 mL、3)の 10 mL、4)の 5 mL を混合したもの、冷蔵保存

6) **滅菌水**　滅菌済みの JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等な品質のもの

7) **G418　GENETICIN(G418)(γ 線滅菌済)**　1 g に 25 mL の滅菌水を加えて 40 mg/mL に調製し、0 ℃以下で凍結保存したもの

8) **ペニシリン・ストレプトマイシン**　10000 units ペニシリン・10 mg/mL ストレプトマイシン、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、0 ℃以下凍結保存

9) **トリプシン溶液**　1×solution、0 ℃以下凍結保存

10) **ハンクス緩衝液**　炭酸水素ナトリウム含有、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済

11) **リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))**　マグネシウム及びカルシウム不含

12) **発光基質**　東洋インキ製　ピッカジーン発光キット

13) **標準物質**　2,3,7,8-TeCDD　(50 μg/mL DMSO)

14) **炭酸ガス**　CO_2 99.5 %

15) **液体窒素**

16) **細胞凍結用保存液**　1)、2)、DMSO 及び 7)を 40：50：9：1 の割合で混合したもの、使用時に毎回調製する

2.3　器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1) **培養シャーレ(ペトリ皿)**　φ100 mm、滅菌済のもの

2) **培養マイクロプレート**　96 ウェル、滅菌済のもの

3) **メスピペット**　50 mL 及び 10 mL、滅菌済のもの

4) **遠心管**　50 mL 及び 10 mL、滅菌済のもの

5) **三角フラスコ**　滅菌済のもの

6) **ビーカー**　滅菌済のもの

7) **マイクロピペット用滅菌チップ**　200μL、1000μL 、滅菌済のもの

8) **マイクロピペット用チップ**　200μL、1000μL

9) **マイクロピペット**　5～20μL 、20～200μL、200～1000μL

10) **12 チャンネルマイクロピペット**　5～50μL 、50～300μL

11) **ピペットエイド**　メスピペットに取り付けて液の出し入れに使用できるもの

12) **安全キャビネット**　クラスⅡのもの

13) **インキュベーター**　37 ℃恒温、飽和湿度、5 % CO_2 濃度

14) **ウォーターバス**

15) **遠心分離機**　1000 rpm で遠心分離できるもの

16) **試験管ミキサー**

17) **血球計算盤**

18) **光学顕微鏡**

19) **カウンター**

20) 微量遠心管

21) 試験管 ϕ12×75 mm

22) マイクロプレートミキサー

23) ルミノメーター

24) オートクレーブ

25) 凍結保存用バイアル 2 mL、滅菌済のもの

26) 凍結処理容器 BICELL 又はそれと同等の性能を有するもの、又はプログラムフリーザー

27) ドライアイス又はディープフリーザー -80 ℃

28) 液体窒素保管容器

29) 吸引装置(アスピレーター)

30) リザーバー

３．細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の起眠

1) 液体窒素保管容器から 101L 細胞の入った凍結保存用バイアルを取り出し、37 ℃のウォーターバス中で解凍する。

2) バイアルの内容物を培養シャーレに移した後、培養液 12 mL を加えて混和する(注 2)。

3) 培養シャーレをインキュベーターに入れ、5 時間程度培養する。

4) 培養シャーレをインキュベーターから取り出し、培養液を取除き、新しい培養液を 12 mL 加えた後、G418 及びペニシリン･ストレプトマイシンを 120µL ずつ加えて混和する（終濃度で G418：0.4 mg/mL、ペニシリン 100 units、ストレプトマイシン 0.1 mg/mL になるように調製する）(注 2)。

5) 培養シャーレをインキュベーターに入れ、3～4 日間培養する。

6) 継代操作を繰り返し、細胞が安定して増殖するようになったことにより、細胞に異常がないことを確認し測定に使用する。

3.2 細胞の継代

1) 培養シャーレをインキュベーターから取り出し培養液を取り除く。トリプシン溶液を 2 mL 分注し混和する（細胞の成育状況に応じてトリプシンの分注量を増減してもよい。）(注 2)。

2) 培養シャーレをインキュベーターに 8 分間入れる。

3) 培養シャーレをインキュベーターから取り出し、1)で使用したトリプシン溶液と等量の培養液を分注し混和する。
シャーレの底面に張り付いている細胞はメスピペットを用いてピペッティングで剥がして遠心管に移す(注 2)。

4) 遠心管を遠心分離機に入れ、1000 rpm で 5 分間遠心分離操作を行う。

5) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に培養液を適量加えてピペッティングし、懸濁液を作製する(注 2)。

6) 懸濁液の一部を微量遠心管に移し、ハンクス緩衝液等の緩衝液又は培養液をマイクロピペットで適量加えて希釈する(注 2)。

7) よく混和した懸濁液を血球計算盤に適量分注し、顕微鏡で細胞数をカウントして懸濁液の濃度

(cells/mL)を計算する。

8) 作製する培養シャーレ 1 枚当り 12 mL、培養マイクロプレート 1 枚当り 24 mL を目安として、調製に必要な液量を計算する。

9) 125,000 cells/mL の濃度調製に必要な懸濁液量と培養液量を計算し、両者の合計量の 1/100 量に相当する G418 及びペニシリン・ストレプトマイシン量を計算する（終濃度で G418：0.4 mg/mL、ペニシリン 100 units、ストレプトマイシン 0.1 mg/mL になるように調製する）(注 2)。

10) G418 及びペニシリン・ストレプトマイシンと培養液を混合した後、懸濁液を加えて混和し、培養シャーレ 1 枚当たり 12 mL ずつ、培養マイクロプレートの 1 ウェル当たり 200 µL ずつ分注する。培養マイクロプレートに分注する際は、懸濁液をリザーバーに移し、12 チャンネルマイクロピペット等で分注する(注 2)。

11) インキュベーターに入れ、3～4 日間培養する。

12) 試験に使用する細胞株は 3～4 日間で 3～5 倍程度に増殖するのでそれを目安として作製する培養シャー

13) 細胞の継代操作は起眠後 25 回までを目安とし、期限前であっても測定に支障が生じる等細胞に問題があると考えられる場合にはそれ以後の継代には使用せず廃棄する。

14) インキュベーター内で細胞を培養中に停電した際には、温度及び CO_2 濃度の低下を極力抑えるため、扉の開閉を控える。復旧後細胞の状況を確認し、問題があると考えられた場合には使用せず廃棄する。

3.3 細胞の保存

下記に細胞保存の例を記載する。

1) 3.2 の 1)～7）の方法で細胞懸濁液を調製する。

2) 細胞懸濁液を遠心管に移し(注 2)、遠心分離機に入れ、1000 rpm で 5 分間遠心分離操作を行う。

3) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に細胞凍結用保存液を加えてピペッティングし、細胞懸濁液の濃度が 2.0×10^6～4.0×10^6 cells/mL 程度になるよう調製する(注 2)。

4) 凍結保存用バイアルに 1 mL ずつ分注(注 2)して凍結処理容器の中に入れ、ドライアイス入りの箱又はディープフリーザー（－80 ℃）に 3 時間程度入れる。

5) 凍結保存用バイアルを取り出し、液体窒素保管容器の中に入れて保存する。

(注 2）安全キャビネット内で無菌操作を行う。

4．測定操作

4.1 細胞の培養マイクロプレートへの播種

1) 3.2 の 9)で調製した懸濁液を培養マイクロプレートの各ウェルに 200µL ずつ分注する(注 2)。

2) 培養マイクロプレートをインキュベーターに入れ、3～4 日間培養する。

4.2 曝露

1) 測定値が定量範囲内に入るよう必要に応じて、第 4 節 4.3 の 4)で調製した測定用試料に DMSO を加えて希釈系列試料を作製する。試料希釈の例を表 3-2-1 に示す。

2) ブランク溶媒、検量線作成用標準液(STD：濃度調製例 0.5、1、2、5、10 ng/mL))、及び 1)で作製した希釈系列試料を試験管内で培養液で 100 倍希釈し、測定用試料液を調製する(注 2)。

3) 3～4 日間培養した培養マイクロプレートをインキュベーターから取り出し、ウェル中の培養液をアスピレーター等で吸引除去する(注 2)。

4) 2）で調製したブランク溶媒、STD、希釈系列試料の測定用試料液を培養マイクロプレートの各ウェルに 50 µL ずつ、2 つ以上のウェルに分注する。同一操作で扱う培養マイクロプレートが複数枚ある場合には、それらを 1 つのバッチとして扱い、バッチごとに STD を入れる(注 2)。

5) ウェルプレートでの試料の配置例を図 3-2-7 に示す。

6) 培養マイクロプレートをインキュベーターに入れ、16±0.5 時間曝露する。

表 3-2-1 試料希釈の例

1 倍試料、5 倍希釈試料、25 倍希釈試料、125 倍希釈試料、625 倍希釈試料を作製する際の調製例

試料	希釈元	分取量（µL)	DMSO 分注量（µL)
1 倍試料	1 倍試料	--	0
5 倍希釈試料	1 倍試料	20	80
25 倍希釈試料	5 倍希釈試料	20	80
125 倍希釈試料	25 倍希釈試料	20	80
625 倍希釈試料	125 倍希釈試料	20	80

	DMSO	DMSO	STD1	STD1	STD2	STD2	STD3	STD3	STD4	STD4	
	STD5	STD5	QC 試料	QC 試料	試料 1-1	試料 1-1	試料 1-2	試料 1-2	試料 1-3	試料 1-3	
	試料 1-4	試料 1-4	試料 1-5	試料 1-5	試料 2-1	試料 2-1	試料 2-2	試料 2-2	試料 2-3	試料 2-3	
	試料 2-4	試料 2-4	試料 2-5	試料 2-5	試料 3-1	試料 3-1	試料 3-2	試料 3-2	試料 3-3	試料 3-3	
	試料 3-4	試料 3-4	試料 3-5	試料 3-5	試料 4-1	試料 4-1	試料 4-2	試料 4-2	試料 4-3	試料 4-3	
	試料 4-4	試料 4-4	試料 4-5	試料 4-5	試料 5-1	試料 5-1	試料 5-2	試料 5-2	QC 試料	QC 試料	

図 3-2-7　96 ウェルプレート上での試料の配置例(注 3)

(注 3）プレートの外周部分のウェルは、培養中に培養液の蒸発等の影響を受けやすいため、原則として定量には使用しない。

4.3　ルシフェラーゼ活性の測定

1) 曝露が終わった培養マイクロプレートをインキュベーターから取り出し、ウェル中の測定用試料液をアスピレーター等で吸引除去する。

2) 培養マイクロプレートの各ウェルに PBS(-)を 100 µL 加え、アスピレーター等で吸引除去する。

3) 各ウェルに細胞溶解液を 50 µL 加え、室温で 10 分間放置する。

4) 培養マイクロプレートをマイクロプレートミキサーにセットし、5 分間撹拌する。

5) ルミノメーターに発光基質及び緩衝液をセットし、ルミノメーターに接続されたコンピュータ等に設定条件を入力する。

6) 培養マイクロプレートをルミノメーターにセットし、緩衝液及び発光基質を適量自動分注させ、発光基質分注 1 秒後から 2 秒後までの 1 秒間の RLU を測定する。

５．定量

5.1　検量線の作成

1) ルミノメーターで測定した STD の発光量（RLU)をブランク溶媒の発光量（RLU)で除し、fold induction(発光量比)を求める。
2) STD の濃度(X)及び fold induction (Y)について、一次回帰式による検量線を作成する。一例を図 3-2-8 に示す。

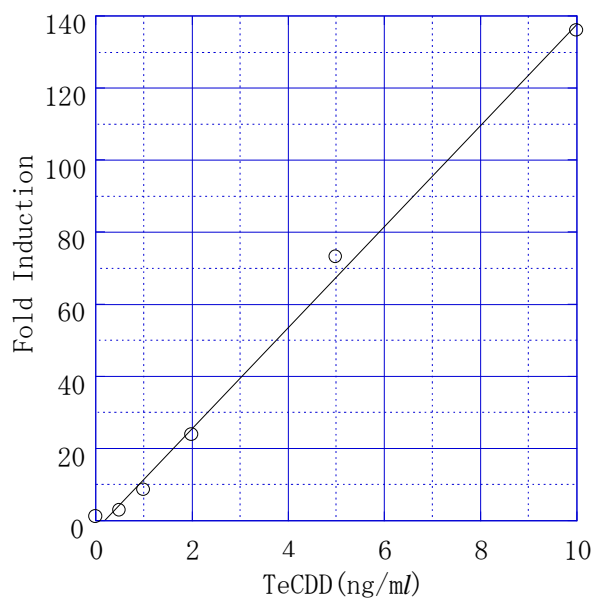



図 3-2-8　検量線例

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、検量線作成用標準液の測定操作により得られたデータから、測定量（毒性等量）を求め、管理図に記録し保存する。管理図による処置基準は、管理限界（μ±２σ）からの逸脱状況及び図の傾向等に応じて下記の通りとする（μ：工程平均、σ：測定量（毒性等量）の標準偏差)。

データが 1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

5.1 により作成した検量線の 10 ng /mL の点の検量線による換算値（ng-TEQ/mL）を算出し、管理図にプロットする。一例を図 3-2-9 に示す。

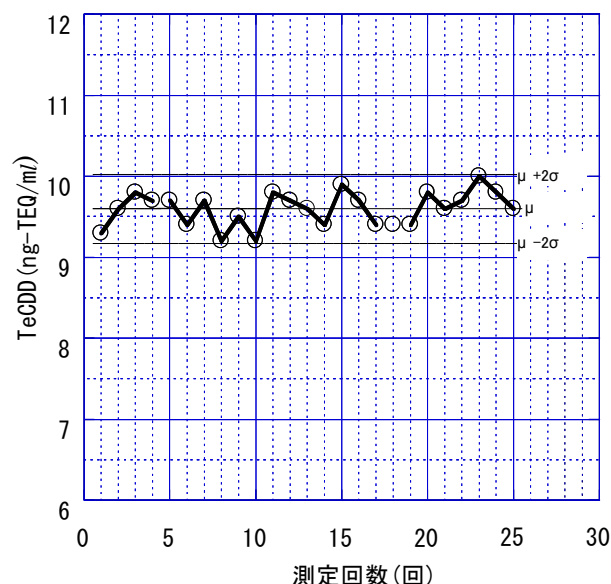



図 3-2-9　管理図例

5.3　測定試料の定量

1) ルミノメーターで測定した試料の発光量をブランク溶媒の発光量で除し、fold induction を求める。

2) 測定試料の fold induction を検量線の回帰式に代入し、測定値を求める。

3) 検量線の定量範囲内にある fold induction のうち、試料の希釈倍率と測定値の間に良好な直線関係(希釈直線性)が得られる希釈段階について、測定値に希釈倍率を乗じて実測濃度(測定用試料当たり）を求める。

4) で求めた実測濃度(測定用試料当たり）について、抽出に供した実試料及びクリーンアップ、測定に供した試料の分取割合等から単位測定試料量当たりの実測濃度を算出する。

5) 試料希釈列の全ての fold induction が検量線の定量範囲から外れた場合、試料の希釈倍率を再度調製した上で測定を行う。

（備考）排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C　：　酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m^{3}N)
Os　：　排出ガス中の酸素の濃度(注 4)(%)
Cs　：　排出ガス中の実測濃度(ng/m^{3}N)

（注 4）排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、0s=20 とする。

６．検出下限及び定量範囲

6.1　標準物質における検出下限及び定量範囲

第２章各論（生物検定法に共通する事項）第３節では、非線形検量線を対象とした「原則として、検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定量（毒性等量）の定量値の変動係数(CV%)が30 %以下となる点を検出下限、20 %以下となる点を定量下限とする」としているが、本方法では、線形検量線を使用するため、本マニュアル第２章第３節に記載の通り、上記算出方法を誘導する際の元となった方法「測定値の標準偏差を検量線の傾きで割った数値を求め、その3.3倍に相当する標準物質濃度を検出下限、10倍に相当する

標準物質濃度を定量下限とする」により検出下限及び定量下限を求め、検量線が直線となる最大濃度（通常10 ng/mL）迄を定量範囲とする。

この標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも6ヶ月に1回十分な性能が得られていることを確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認する。

1) 検出下限等算出用標準溶液の調製例

2,3,7,8-TeCDD 標準溶液を DMSO で希釈し、検出下限等算出用標準溶液を調製する。

調製濃度の例：ブランク（DMSO）、0.1、0.3、0.5 ng/mL

2) 検出下限及び定量範囲の算出例

(1) 1)で調製した検出下限等算出用標準溶液を n=5 以上で測定し、ブランク RLU を差し引いた RLU から、直線回帰検量線を作成する。検出下限等算出用検量線の例を、図 3-2-10 に示す。

(2) ブランクの各測定値（RLU）の平均値と標準偏差を算出する。

(3) (2)で求めた標準偏差を、(1)で求めた検量線の傾きで割る。

(4) (3)で得られた数値の 3.3 倍に相当する標準物質濃度を検出下限、10 倍に相当する標準物質濃度を定量下限とし、検量線に直線性の認められる範囲(通常約 10 ng/mL)迄を定量範囲とする。

算出例を表 3-2-2 に示す。

表 3-2-2　検出下限及び定量下限の算出例

ブランク（DMSO）の RLU					標準偏差	傾き
195	244	202	224	196	21.3	932
検量線回帰式：RLU=932×TeCDD　(R^2=0.990)						
検出下限＝21.3÷932×3.3＝0.075 ng/mL						
定量下限＝21.3÷932×10　＝0.23 ng/mL						

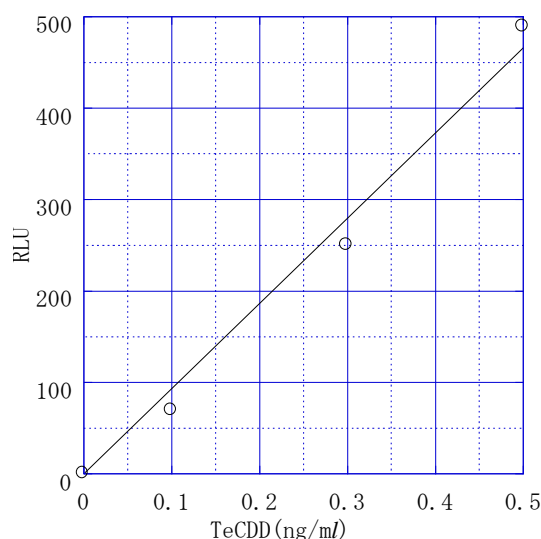



図 3-2-10 検出下限等算出用検量線例

3) 実運用上における検出下限及び定量下限

上記の計算を用いた検出下限及び定量下限の値は測定機器の安定性が高い場合にはかなり低い数値とし

て計算される場合がある。しかし現実の運用上は測定機器の分解能等から考え、標準物質の測定値がブランクの測定値に対し 1.5 倍～2 倍以上の RLU（Fold Induction として 1.5～2.0 以上）を与える濃度以上で定量することが望ましい。現状の測定系で実際に使用している検出下限及び定量下限を表 3-2-3 に示す。

表 3-2-3　標準物質における検出下限及び定量下限の実運用例

検出下限		定量下限	
0.15 pg/well	0.3 ng/mL	0.25 pg/well	0.5 ng/mL

6.2　試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、実運用上の検出下限及び定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

表 3-2-4　試料における検出下限算出例（排出ガス）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1well 中 試料量 μL/well	採取量 m^3N	酸素濃度 %	分取液量/抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/m^3N
排出ガス	0.15	0.5	4	12	10/20	0.08	1	0.01

表 3-2-5　試料における検出下限算出例（ばいじん及び燃え殻）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1well 中 試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量/抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/g
ばいじん 及び 燃え殻	0.15	0.5	5	100	10/10	0.2	1	0.01

表 3-2-6　試料における定量下限算出例（排出ガス）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	定量下限 pg/well	1well 中 試料量 μL/well	採取量 m^3N	酸素濃度 %	分取液量/抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/m^3N
排出ガス	0.25	0.5	4	12	10/20	0.08	1	0.02

表 3-2-7　試料における定量下限算出例（ばいじん及び燃え殻）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	定量下限 pg/well	1well 中試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量/抽出液量 mL/mL	最終定容量 mL	希釈倍率	実測濃度 ng/g
ばいじん及び燃え殻	0.25	0.5	5	100	10/10	0.2	1	0.02

７．測定量(毒性等量)への換算

5.3 で求めた実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻ともに換算係数を乗じることで測定量(毒性等量)に換算する。なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第６節記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成4年厚生省告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法4.1～4.3及び5.3に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

多数の排出ガス試料(この例では n=32、n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。
2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-2-11 では Y/X の平均値である 1/5.4 を換算係数とした)。

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

多数のばいじん及び燃え殻試料(この例では n=41、n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。
2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-2-12 では Y/X の平均値である 1/5.2 を換算係数とした)。

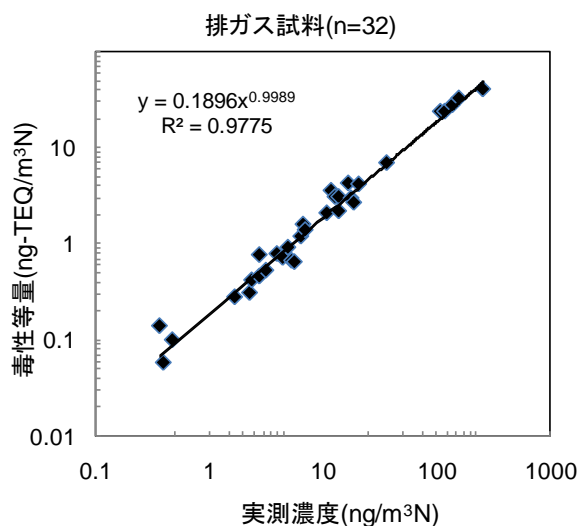



図 3-2-11　換算係数算出(例)
(排出ガス)

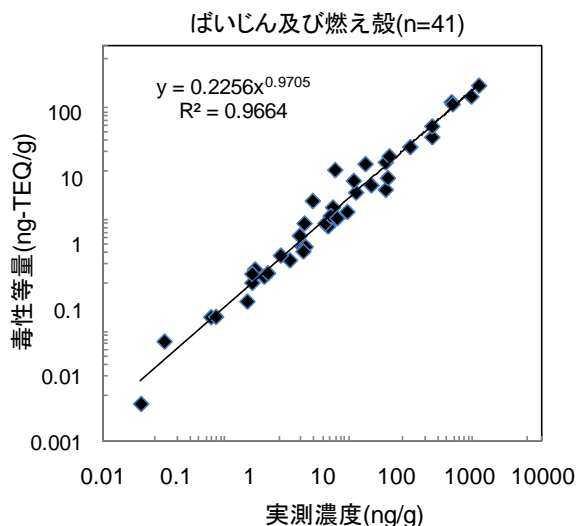



図 3-2-12　換算係数算出(例)
(ばいじん及び燃え殻)

その３　前処理に、多層カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 3)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いたレポータージーンアッセイによる測定により定量する。測定方法のフローを図 3-3-1 に示す。

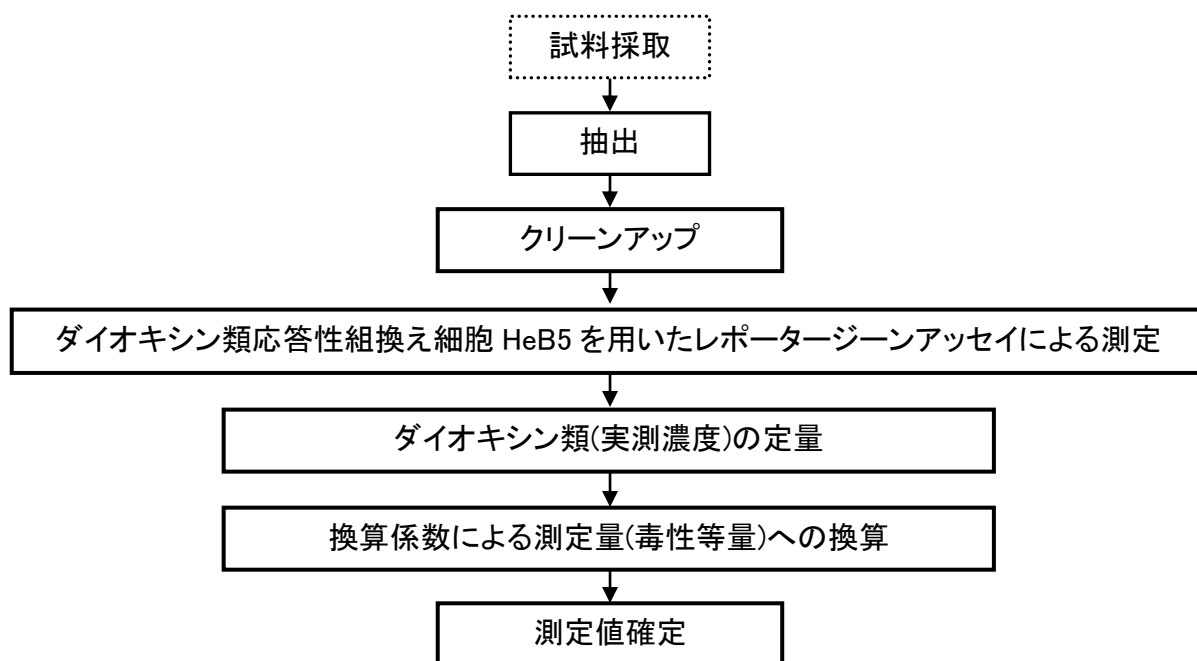



図 3-3-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **Ah 受容体**　Arylhydrocarbon Receptor。アリール炭化水素受容体。特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。
2) **ルシフェラーゼ遺伝子**　Luciferase Gene。生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子。
3) **XRE**　Xenobiotics Responsive Element。生体異物応答配列
4) **継代培養**　Subculture。保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの。
5) **発光基質**　生物発光反応の基質。
6) **精度プロファイル**　精度確認用の標準溶液濃度と変動係数(CV%)との関連図。

第 3 節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V ： 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

C_{DL} ： 必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m^3N)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/m^3N)

抽出液を 50mL に定容し､その抽出液から 25mL を分取してクリーンアップを行い､最終的に 0.07mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限値は 100pg/mL、排出ガスの測定量への換算係数は 0.319 を用いた。

$$V = \frac{100 \times 0.319 \times 0.07}{1000} \times \frac{50}{25} \times \frac{1}{0.17} = 0.026$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1) で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W ： 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V_E　：　抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：　必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4)　算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 50mL に定容し、その抽出液全量を用いてクリーンアップを行い、最終的に 0.07mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限値は 100pg/mL、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数は 0.390 を用いた。

$$W = \frac{100 \times 0.390 \times 0.07}{1000} \times \frac{50}{50} \times \frac{1}{0.1} = 0.027$$

第４節　試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-3-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

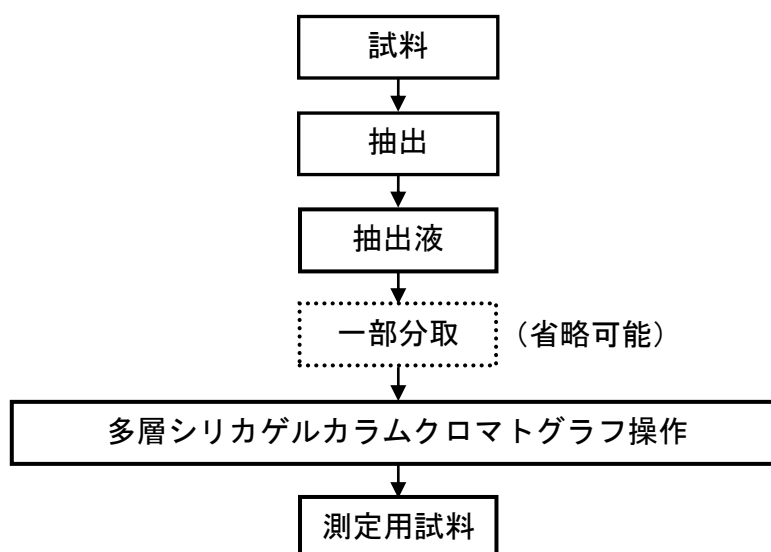



図 3-3-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　**水**　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの

2)　**メタノール**　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの

3)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの

4)　トルエン　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの

5)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの

6)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの

7)　ジメチルスルホキシド(DMSO)　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)

8)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの

9)　塩酸　JIS K8180 に規定するもの、又は同等の品質のもの

10) 硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの

11) ヘキサン洗浄水　1)の水を 6)のヘキサンで十分洗浄したもの

12) シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

13) 水酸化カリウム(2%質量分率)シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

14) 硫酸(44%質量分率)シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

15) 硝酸銀(10%質量分率)シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

16) アルミナ　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

17) ガラス繊維ろ紙　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

18) 窒素　JIS K01107 に規定するもの、又は同等の品質のもの

19) 酢酸　JIS K8355 に規定する特級、又は同等の品質のもの

20) 無水酢酸　JIS K8886 に規定する特級、又は同等の品質のもの

21) テフロンフィルタ　孔径 0.5μm 以下のもので、ダイオキシン類の吸着や妨害成分の溶出がないもの

(注 1) ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1　ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2　ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3　濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4　還流抽出器

3.2 のソックスレー抽出器(JIS R3503 付図 71)の抽出塔を外して、代わりに共通すり合わせ直管形連結管(JIS R3503 付図 76)により、共通すり合わせ球管冷却器と共通すり合わせ短首平底フラスコを連結したもの、又は同等のもの

3.5　超音波洗浄器

水槽を約 50℃に加温でき、38kHz 前後の超音波を発振できるもの

3.6　マントルヒーター

3.2 のソックスレー抽出器及び 3.4 の還流抽出器を加熱し、還流させることが出来るもの

4．前処理操作

4.1　試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2　抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 3-3-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

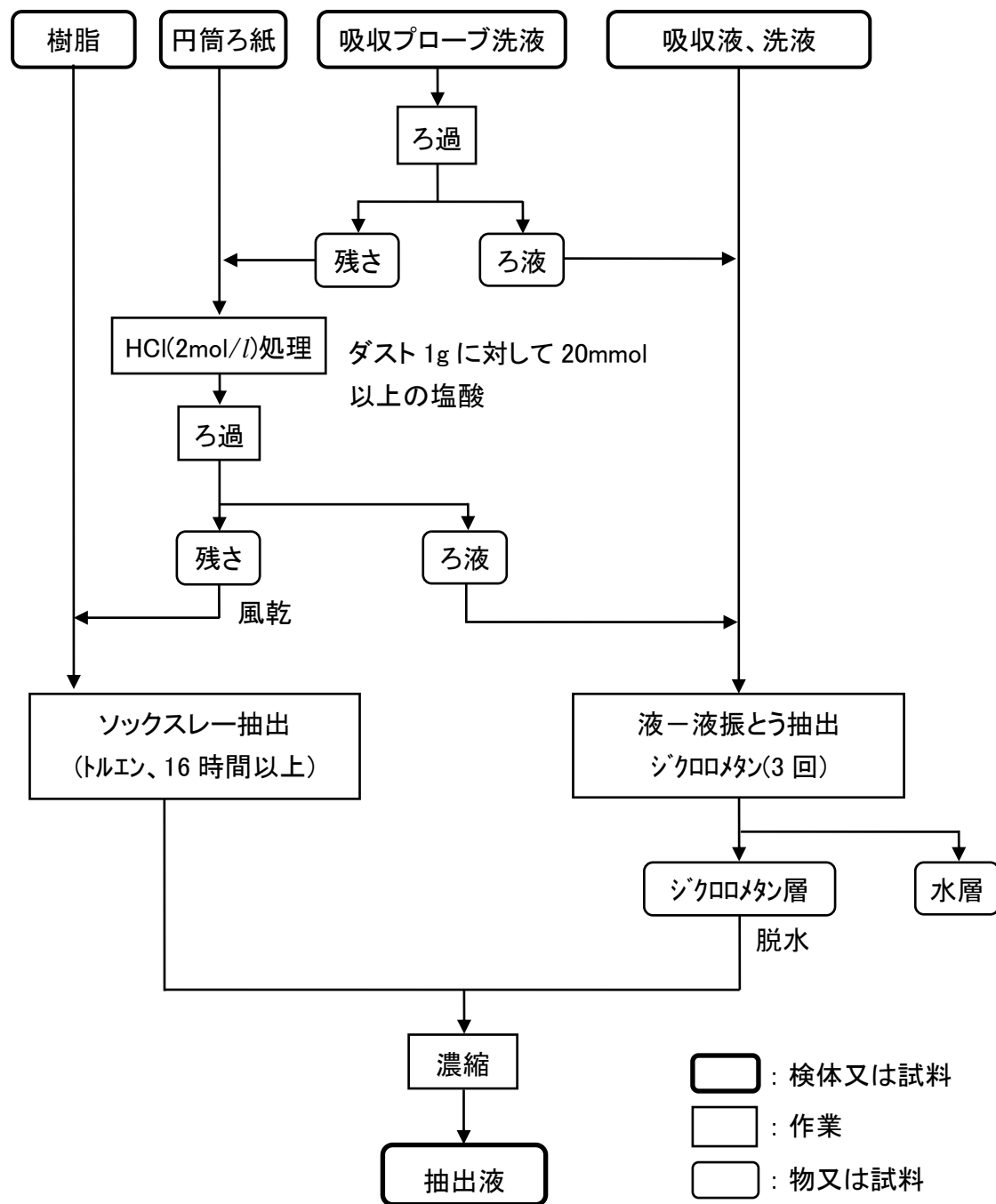



図 3-3-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

2) ばいじん及び燃え殻

試料を酢酸に浸して酸処理を行った後、還流抽出器にかけて抽出を行い、硫酸ナトリウムによる脱水後に、濃縮器等で濃縮する。分取して用いる場合はこれを一定量とする。

図 3-3-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

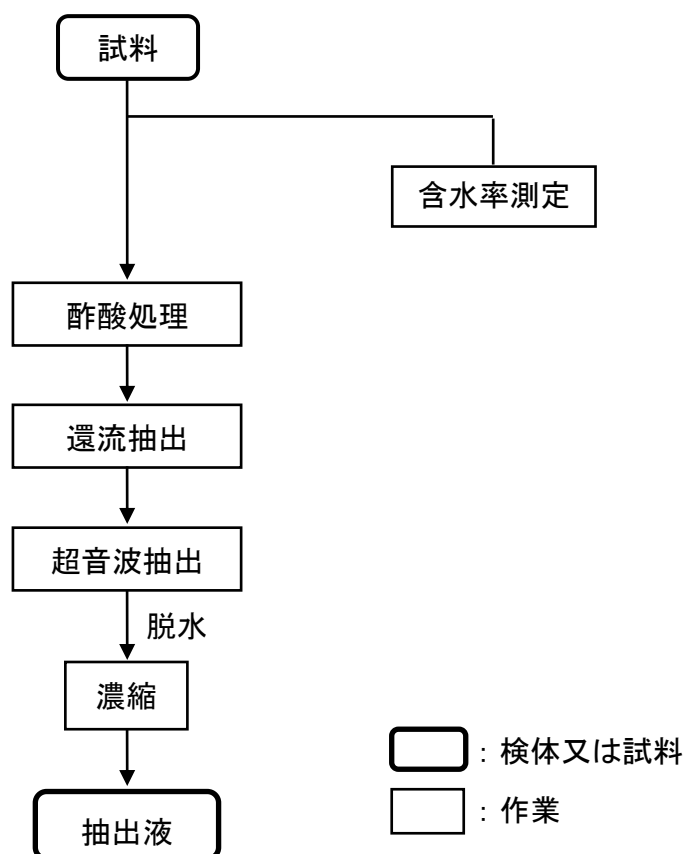



図 3-3-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

1)　分析試料採取

試料約 2g を共通すり合わせ短首平底フラスコ等に採取する。水分の多い試料の場合は風乾を行った後に採取することが望ましい。

2)　酢酸処理

酢酸を 10mL 加える。湿りのある、発泡や発熱が著しいサンプルについては、さらに無水酢酸を 10mL 添加する。その後、超音波洗浄器に 10 分以上かける。

3)　還流抽出

酢酸処理を行った平底フラスコにトルエン 50mL を加え、直管形連結管により、球管冷却器と平底フラスコを連結し、2 時間以上還流抽出を行う。(酢酸処理の酢酸は、還流抽出前に取り出す必要は無く、トルエンを追加してそのまま還流を行うことができる。酢酸又は無水酢酸を追加している場合には還流抽出前に酢酸を取り出し、抽出後のトルエンと合わせる方が良い。)

4)　超音波抽出

還流抽出後、超音波洗浄器に約 20 分かける。

5)　脱水ろ過

ガラスロートに石英ウールをいれ、その上に無水硫酸ナトリウムを約 50g 敷き詰め、あらかじめヘキサン 100mL で洗浄した脱水用ロートをセットした 300mL ナスフラスコに試料液を移して脱水ろ過する。トルエンで 3 回、ヘキサンで 3 回洗浄する。1 回では脱水が不充分な場合は、濃縮後に再度、無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を繰り返す。

4.3　クリーンアップ

図 3-3-5 にクリーンアップのフローを示す。

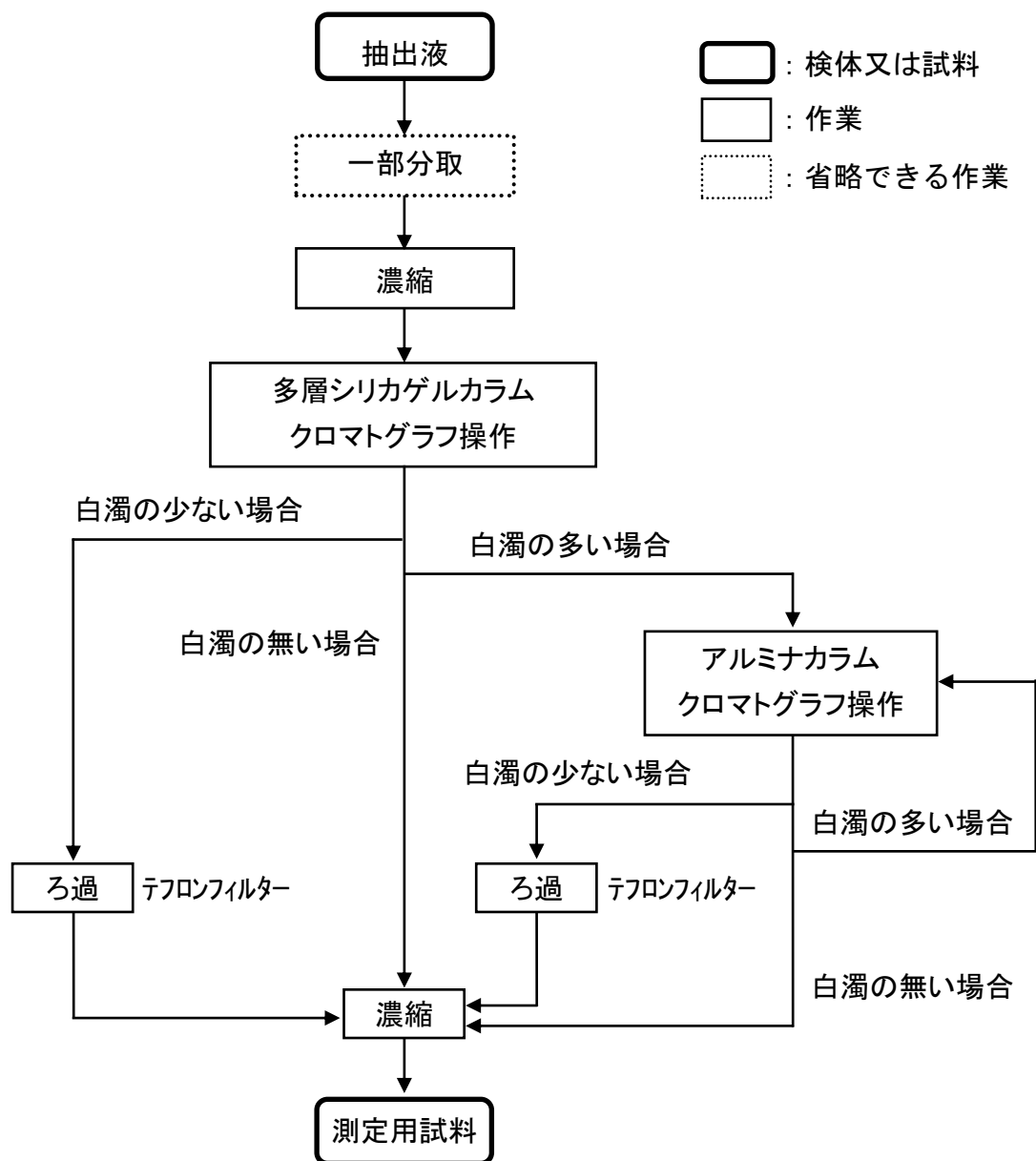



図 3-3-5　クリーンアップのフローの例

1)　抽出液の分取

抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。(通常、抽出液の 1/1～1/10 程度を用いる。高濃度であることが予想される場合には、より少量を分取してもよい。)

2)　精製カラムの作製

(1)　多層シリカゲルカラム

a) 石英ウールを詰めたガラスクロマト管(内径 15mm)に、図 3-3-6 に示すように、下から、シリカゲル、硝酸銀シリカゲル、シリカゲル、水酸化ナトリウムシリカゲル、シリカゲルをトルエンでクロ

マト管に湿式充填により積層する。

b) ヘキサン 30mL を通液し、カラム内の溶媒をヘキサンに置換する。

c) 硫酸(44%質量分率)シリカゲル、シリカゲル、硫酸ナトリウムをヘキサンで湿式充填により積層する。

d) ヘキサン 100mL を通液し、充填カラム全体の洗浄を行う。ヘキサンの液面が無水硫酸ナトリウムの上面まで下がったところで通液を止める。

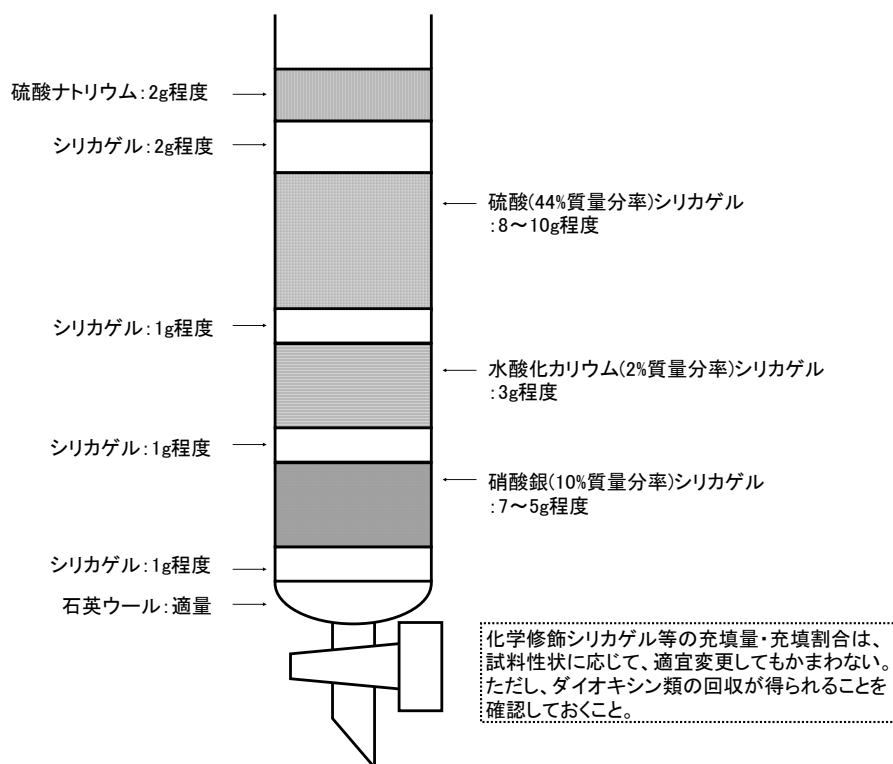



図 3-3-6　多層シリカゲルカラムの例

(2)　アルミナカラム

石英ウールを詰めたガラスクロマト管(内径 10mm)に、アルミナ 10g を湿式充填により充填する。ただし、アルミナカラムは試料の性状によって必要な場合のみ使用するため、必要の都度、作製する。

3)　クリーンアップ操作

クリーンアップは、2)の(1)多層シリカゲルカラム、(2)アルミナカラム、及び孔径 0.5µm 以下のテフロンフィルタ等を用いて、図 3-3-5 のフローに従って行う。

4)　溶媒置換及び測定用試料の保存

溶媒置換は、トルエン、ヘキサン等の極性の低い溶媒から、DMSO への転溶を行う。溶媒置換はロータリーエバポレータ等の濃縮器を用いて、可能な限り無極性溶媒の量を減じる。

約 50mL のアセトンを加えて再度、濃縮器で濃縮を行う。この操作を 3 回繰り返す。その後、アセトンに、測定用試料として必要な量の DMSO を添加して濃縮する。

濃縮液は、測定用試料の保存容器にアセトンを用いて洗い込む。アセトンによる洗い込み及び、窒素吹付け等による濃縮を繰り返し、最終的に DMSO のみの溶液に調製する。

測定用試料は、測定するまでの間、室温で暗所に保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光量を発光光度計で測定することによりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の発光量から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．試薬、器具及び装置

2.1　使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 : レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、その上流域に生体異物応答配列ＸＲＥを５個配置したプラスミド pGL3－chTATA－YaXREx5－bsd を、マウス肝がん細胞由来 Hepa－1clc7 に導入したもの

2.2　試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1)　培地　αMEM、$NaHCO_3$(特級)

2)　Fetal Bovine Serum(FBS)　56℃、30 分間非働化処理済、-20℃凍結保存

3)　リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))　マグネシウム及びカルシウム不含

4)　トリプシン溶液　0.25%、0℃以下凍結保存

5)　細胞分散用試薬　0.25%トリプシン溶液／1mM EDTA 溶液

6)　ブラストサイジン S(Bsd)　塩酸塩 1%含有

7)　細胞凍結用保存液

8)　発光基質　ルシフェリン及び組成物

9)　細胞溶解液　ホタルルシフェラーゼによる発光が測定可能なもの

10)　標準溶液　2,3,7,8-TeCDD (50μg/mL DMSO)

11)　ジメチルスルホキシド(DMSO)　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)

12)　水　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等な品質のもの

13)　炭酸ガス　CO_2 99.99%

14)　液体窒素

2.3　器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1)　細胞培養用プレート　ϕ100mm 培養シャーレ(ペトリ皿)

2)　培養／アッセイ用プレート　96 ウェルプレート

3)　ピペット　滅菌ピペット 10mL、25mL 等

4)　滅菌用フィルター　0.22μm

5)　マイクロピペット及びマルチチャンネルピペット用チップ類　200μL、1000μL、1200μL 等

6)　細胞凍結保存用チューブ

7)　血球計算盤

8)　96 ウェルディープウェルプレート　ポリプロピレン製、試料を培地に添加・混合するのに用いる

9)　リザーバー　細胞懸濁液の調製、分注に用いる

10)　マルチチャンネル(8ch 又は 12ch)ピペッター　電動又はマニュアル

11)　マイクロピペット

12)　インキュベーター　37℃恒温、飽和湿度、5% CO_2 濃度

13)　安全キャビネット　クラスⅡB

14)　オートクレーブ

15)　培養用倒立位相差顕微鏡

16)　ルミノメーター　マルチウェル発光プレートリーダー

17)　ディープフリーザー　－80℃

18)　液体窒素保存容器(細胞保存用)

19)　培地吸引装置(吸引ポンプ、トラップ及びチューブ等一式)

20)　吸引装置（アスピレーター）

３．細胞の取り扱い

3.1　培養細胞の起眠

1)　培地の調製

粉末 αMEM培地(1L 分)を超純水に溶解した後、$NaHCO_3$ を 2.2g 添加・溶解し(黄色透明→赤色透明)、超純水で 1L 容とする。これを滅菌用フィルターで減圧濾過し、この無血清培地 500mL に対し、50mL の FBS を混合し、10%血清入り培地とする。培地の容器を開放する(フィルターを取り外す、又は蓋を開ける)等の無菌操作が必要な場合は安全キャビネット内で行う。安全キャビネット内に物品及び手を入れる際、約 80%エタノールのスプレーでそれらを消毒する。

ブラストサイジン S(Bsd)含有培地は以下のように調製する。Bsd が粉末の場合はまず PBS(-)に溶解し、0.22μm のフィルターでろ過滅菌する。滅菌済み Bsd 溶液は適当量(目安として 2mg/mL の濃度で 4mL ずつ)小分けし凍結保存しておくと良い。この Bsd 溶液を上記 10%血清入り培地の Bsd の終濃度が 16μg/mL となるように添加・混合する。

2)　細胞の立ち上げ

冷蔵庫に保管している Bsd 含有/10%血清入り培地を、37℃恒温水槽であらかじめ温めておく。前記培地をϕ100mm の培養シャーレに 10mL 注ぐ。液体窒素又はディープフリーザーで保存した細胞入り細胞凍結保存用チューブを取り出し、直ちに 37℃恒温水槽で細胞凍結保存用チューブを振りながら融解する(1～2 分程度)。細胞凍結保存用チューブの外側を 80%エタノール噴霧により消毒し、融解した細胞懸濁液を培地入りϕ100mm 培養シャーレに注ぐ。凍結塊が残っている状態で培地を少量添加し、融解・懸濁させて培養シャーレに注いでも良い。培養シャーレを縦及び横方向に数回ゆすって細胞を拡散させた後、この培養シャーレをインキュベーターに入れて培養する。培養条件は、CO_2 5%、37℃、飽和湿度に設定する。起眠後、継代 3 回目から試験に用いる。

3.2　細胞の継代

通常、細胞が培養シャーレの底面一杯を覆うまで増殖する前に細胞を継代する。使用する培地及び PBS(-)をあらかじめ 37℃恒温槽で温めておく。培養シャーレをインキュベーターから取り出し、80%エタノールを噴霧して消毒後、安全キャビネット内に入れる。培養シャーレに付着しているエタノール液をふき取っておく。片手で培養シャーレを持ち、蓋を開け(全開にはしない)、先にチップ(200μL)を装着したアスピレーター等で培地を吸引除去する。次に PBS(-)をピペットで 5mL 程度、培養シャーレの側面に液を当てながら注入する。培養シャーレを傾ける等により PBS(-)が培養シャーレの底面全体に行き渡るようにする。洗浄済みの PBS(-)を吸引除去する。細胞分散用試薬(トリプシン/EDTA 溶液)を培養シャーレの側面から 1～2mL 程度注ぎ、培養シャーレを傾けて底面全体に液が行き渡るようにする。細胞分散用試薬(トリプシン/EDTA 溶液)を吸引除去し、培養シャーレを室温で 5～10 分程度静置する。培養用倒立位相差顕微鏡で細胞が底面から剥がれそうになっていること、及び細胞が互いに分離していることを確認したら、培養シャーレの底を手で軽く叩き(タッピング)、細胞を底面から剥離させる。安全キャビネット内で、剥がれた細胞に培地(通常 Bsd 不含/10%血清培地)を 10mL 程度加え、ピペットによる吸引・吐出を繰り返し細胞を分離させる。あらかじめ 10mL の Bsd 含有／10%血清培地を注いだ培養シャーレに、細胞懸濁液の一部(通常 0.3～0.5mL 程度、目的に応じて増減させる)を注ぎ、培養シャーレを縦及び横方向に数回ゆすって細胞を拡散させる。培養シャーレをインキュベーターに入れて培養する。通常、細胞懸濁液の 1/20 を継代培養に用い、2～3 日間培養後、同様に継代を行う。顕微鏡観察で、2 日間の培養で培養シャーレ底面の 70%以上に細胞が安定して増殖するようになったことにより細胞に異常がないことを確認する。継代は 20 代程度までを使用の目安とする。継代中の細胞は可能な限り培養環境を一定に保つように留意する。

3.3　細胞の保存

3.2 の記載方法に従って細胞懸濁液を調製後、細胞懸濁液を遠心チューブに移して低速(～1000rpm)で 2～5 分間遠心する。培地を除去した後、細胞ペレットに細胞凍結用保存液を加え、ピペッティングによって穏やかに懸濁させる。懸濁液の濃度は目安として 2×10^6～1×10^7 cells/mL とする。細胞凍結保存用チューブに 0.5～1mL/チューブの割合で細胞懸濁液を分注し、-80℃のディープフリーザーにて凍結させる(-20～-30℃のフリーザーで凍結後、ディープフリーザーに移しても良い)。ディープフリーザーにて凍結後、適宜、細胞凍結保存用チューブを液体窒素保存容器に移して保管する。

４．測定操作

4.1　細胞の 96 ウェルプレートへの播種

3.2 の記載方法に従って細胞を剥離し、10%血清培地(Bsd 不含)により細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液の一部を血球計算盤に採取し、位相差顕微鏡で細胞数を計測する。細胞の数え方は血球計算盤の使用方法に従う。

細胞懸濁液を 10%血清培地(Bsd 不含)で適宜希釈し、10,000～20,000(通常 15,000)cells/100μL 濃度に調製する。希釈細胞懸濁液をリザーバーに注ぎ、マルチチャンネルピペッター等で 96 ウェルプレートに 100μL/well の割合で分注する。この間、細胞懸濁液がなるべく均一になるよう、混合・攪拌に努める。細胞を播種した 96 ウェルプレートをインキュベーターに入れ、培養する。

4.2　曝露

前処理の後、DMSO 溶液とした試料は、適宜、DMSO により希釈する。TEQ 濃度が全く未知の試料の場

合、1 例として、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液、及び 1000 倍希釈液の 4 水準濃度の測定を行う(表 3-3-1)。必要に応じて更に希釈を行う。希釈にはガラス容器等(ダイオキシン類の吸着のない材質製のもの)を用いる。

表 3-3-1　試料の希釈例

	希釈元(μL)	DMSO(μL)
1 倍	原液	0
10 倍	原液　10	90
100 倍	10 倍希釈液　10	90
1000 倍	100 倍希釈液　10	90

試料のほかに、必ず検量線作成のための標準溶液を用意する。1 例として、0(DMSO)、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10、20、50 及び 100pg/μL 濃度の 2,3,7,8-TeCDD の DMSO 溶液を調製する。希釈元には市販の 2,3,7,8-TeCDD に付属の DMSO 溶液が利用できる。

上述各調製 DMSO 溶液を 10%血清培地(Bsd 不含)に添加する。例として、あらかじめ 37℃の恒温槽で温めた 10%血清培地(Bsd 不含)をリザーバーに注ぎ、96 ウェルディープウェルプレートにマルチチャンネルピペッターを用いて 990μL/well 分注する。これに上で調製した試料の DMSO 溶液を 10μL/well 添加する。一連(例えば、96 ウェルプレートの 1 枚分)の試料添加が終了したら、マルチチャンネルピペッターで試料添加済み培地を、吸引、吐出の繰り返しにより混合した後、4.1 で播種し 1 日(約 24 時間)培養した 96 ウェルプレートに 100μL/well の割合で添加する(DMSO 溶液ベースでは 1μL/well:DMSO の終濃度は 0.5%体積分率)。96 ウェルプレート上での試料の配置例を図 3-3-7 示す。通常 4 ウェルの平均値をとることとし、4 ウェルずつに試料を添加する。試料の添加後、96 ウェルプレートをインキュベーターに戻し、培養を続ける。

4.3　ルシフェラーゼ活性の測定

以下に、培地を除去後、細胞を溶解してから発光基質を添加する方法(ノン・ホモジニアスアッセイ)について記す。試料添加の 20～24 時間後に、96 ウェルプレートから培地を吸引除去する。続いて、PBS(-)(非滅菌)をマルチチャンネルピペッターで 80～100μL/well 添加し、96 ウェルプレートを緩やかに傾け(回して)ウェル内を洗浄する(細胞が剥がれないように注意)。PBS(-)を吸引除去し、再び PBS(-)を 80～100μL/well の割合で添加する。同様にウェル内を洗浄後、PBS(-)を吸引除去する。別途作製した細胞溶解液(通常 5 倍濃度のものを超純水で 5 倍希釈する)を 15μL/well 添加する。96 ウェルプレートを傾けてウェル底面全体に溶解剤が行き渡るようにする。時々、96 ウェルプレートを傾けながら、室温で 30 分間細胞を溶解する。細胞が溶解していることを確認後(細胞の溶解後の組織片の目視、あるいは顕微鏡観察)、96 ウェルプレートをラップで包み、冷凍庫に保管する。96 ウェルプレートが複数の場合は前の 96 ウェルプレートの細胞溶解中に培地の除去・洗浄等の作業を行ってよい。

凍結保存した 96 ウェルプレートを取り出し、室温で融解する。融解後は 96 ウェルプレートを傾けて底面全体に液を行き渡らせ、また、ミキサーで攪拌する。室温においてから約 15 分後に 96 ウェルフォーマットのルミノメーターに 96 ウェルプレートをセットする。ルミノメーターのパラメーターは機器付属マニュアルを参照して設定する。表計算ソフト等により、測定結果のデータ処理を行う。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO	0.1 pg/μl	0.2 pg/μl	0.4 pg/μl	0.6 pg/μl	0.8 pg/μl	1 pg/μl	2 pg/μl			
B		DMSO	0.1 pg/μl	0.2 pg/μl	0.4 pg/μl	0.6 pg/μl	0.8 pg/μl	1 pg/μl	2 pg/μl			
C		DMSO	0.1 pg/μl	0.2 pg/μl	0.4 pg/μl	0.6 pg/μl	0.8 pg/μl	1 pg/μl	2 pg/μl			
D		DMSO	0.1 pg/μl	0.2 pg/μl	0.4 pg/μl	0.5 pg/μl	0.8 pg/μl	1 pg/μl	2 pg/μl			
E		3 pg/μl	4 pg/μl	5 pg/μl	10 pg/μl	20 pg/μl	50 pg/μl	100 pg/μl				
F		3 pg/μl	4 pg/μl	5 pg/μl	10 pg/μl	20 pg/μl	50 pg/μl	100 pg/μl				
G		3 pg/μl	4 pg/μl	5 pg/μl	10 pg/μl	20 pg/μl	50 pg/μl	100 pg/μl				
H		3 pg/μl	4 pg/μl	5 pg/μl	10 pg/μl	20 pg/μl	50 pg/μl	100 pg/μl				

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	操作BL (n1) x1000	試料a (n1) x1000	試料b (n1) x1000	試料c (n1) x1000	試料d (n1) x1000	操作BL (n1) x100	試料a (n1) x100	試料b (n1) x100	試料c (n1) x100	試料d (n1) x100	
B	DMSO	操作BL (n2) x1000	試料a (n2) x1000	試料b (n2) x1000	試料c (n2) x1000	試料d (n2) x1000	操作BL (n2) x100	試料a (n2) x100	試料b (n2) x100	試料c (n2) x100	試料d (n2) x100	
C	DMSO	操作BL (n3) x1000	試料a (n3) x1000	試料b (n3) x1000	試料c (n3) x1000	試料d (n3) x1000	操作BL (n3) x100	試料a (n3) x100	試料b (n3) x100	試料c (n3) x100	試料d (n3) x100	
D	DMSO	操作BL (n4) x1000	試料a (n4) x1000	試料b (n4) x1000	試料c (n4) x1000	試料d (n4) x1000	操作BL (n4) x100	試料a (n4) x100	試料b (n4) x100	試料c (n4) x100	試料d (n4) x100	
E		操作BL (n1) x10	試料a (n1) x10	試料b (n1) x10	試料c (n1) x10	試料d (n1) x10	操作BL (n1) x1	試料a (n1) x1	試料b (n1) x1	試料c (n1) x1	試料d (n1) x1	100 pg/μl
F		操作BL (n2) x10	試料a (n2) x10	試料b (n2) x10	試料c (n2) x10	試料d (n2) x10	操作BL (n2) x1	試料a (n2) x1	試料b (n2) x1	試料c (n2) x1	試料d (n2) x1	100 pg/μl
G		操作BL (n3) x10	試料a (n3) x10	試料b (n3) x10	試料c (n3) x10	試料d (n3) x10	操作BL (n3) x1	試料a (n3) x1	試料b (n3) x1	試料c (n3) x1	試料d (n3) x1	100 pg/μl
H		操作BL (n4) x10	試料a (n4) x10	試料b (n4) x10	試料c (n4) x10	試料d (n4) x10	操作BL (n4) x1	試料a (n4) x1	試料b (n4) x1	試料c (n4) x1	試料d (n4) x1	100 pg/μl

図 3-3-7　96 ウェルプレート上での試料の配置例

(上段：検量線プレートの例、下段：試料測定プレートの例)

５．定量

5.1　検量線の作成

濃度既知の標準溶液を 5 濃度水準以上測定し、最小二乗法により回帰させた式を使用する。以下に 2,3,7,8-TeCDD 標準溶液を用い 14 濃度水準で測定して検量線を求める例を記載する。

測定した RLU に関し、4 ウェルの平均値及び標準偏差(s_i)を求める。

2,3,7,8-TeCDD の各濃度に対応する平均 RLU から、DMSO コントロール(0)の平均 RLU を差し引いて、

総 RLU を求める。0 濃度を除き、各 s_i^{-2} を求め、その総和 $\sum_i s_i^{-2}$ を算出する。

次に各 RLU の重み $w_i = s_i^{-2} \Big/ \sum_i (s_i^{-2}/n)$ を求める。

ロジスティック曲線の一般式 $y = \dfrac{\alpha}{1+\beta * e^{-\gamma x}} + \delta$ ・・・(式 I) を基にし、

表計算ソフトで変数 α、β、γ 及び δ パラメーターのセルを設定する(図 3-3-8)。

図 3-3-7 の y の予測値の欄に式 I を入力する。ただし、濃度 X は常用対数 log(x)を用いる。次に試料の RLU y と y の予測値の差の平方(残差平方)を求める(式を入力)。次いで、各残差平方に対応する重み wi を乗じた重み付き残差平方を求める(式を入力)。この重み付き残差平方和が最小となるように変数 α、β、γ 及び δ を算出する。

y = α /(1+β *EXP(−γ *LOG(x)))+δ

α	946789.21
β	15.662918
γ	3.1685912
δ	−801.9887

x	y	yの予測値	残差平方	残差平方*重み	重み付きxの予測値
0.1	1853	1733.8	1.43E+04	1.43E+05	0.10
0.2	7848	5752.1	4.39E+06	1.88E+05	0.25
0.4	14501	16024.3	2.32E+06	6.40E+06	0.37
0.6	31478	28210.0	1.07E+07	9.39E+06	0.65
0.8	42904	41668.8	1.53E+06	1.99E+05	0.82
1	61160	56018.1	2.64E+07	3.85E+05	1.1
2	134792	133794.7	9.95E+05	1.39E+04	2.0
3	201875	211775.0	9.80E+07	2.73E+06	2.9
4	257310	283967.8	7.11E+08	3.22E+06	3.6
5	350956	348555.2	5.76E+06	4.27E+05	5.0
10	579009	569956.5	8.19E+07	1.92E+05	10
20	724430	754322.7	8.94E+08	3.59E+05	17
50	889940	882453.6	5.60E+07	3.49E+04	55
100	918315	920457.2	4.59E+06	1.31E+04	94

残差平方和	1.89E+09	2.37E+07	←最小二乗法計算ｾﾙ

図 3-3-8　表計算ソフトを用いたロジスティック曲線近似式による予測の例

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

検量線の作成例を図 3-3-9 に示す。

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、検量線作成用標準液の測定操作により得られたデータから、測定量(毒性等量)を求め、管理図に記録し保存する。作成した検量線の 50%RLU を求め、検量線からその強度における EC_{50} 値(pg-TEQ/μL)を読み取り管理図にプロットする。一例を図 3-3-10 に示す。管理図による処置基準は、管理限界(μ±2σ)からの逸脱状況に応じて下記の通りとする。

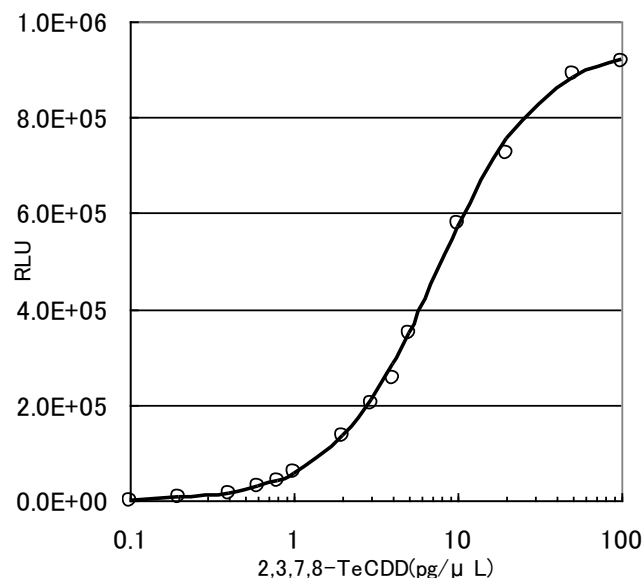



図 3-3-9 検量線の例

1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

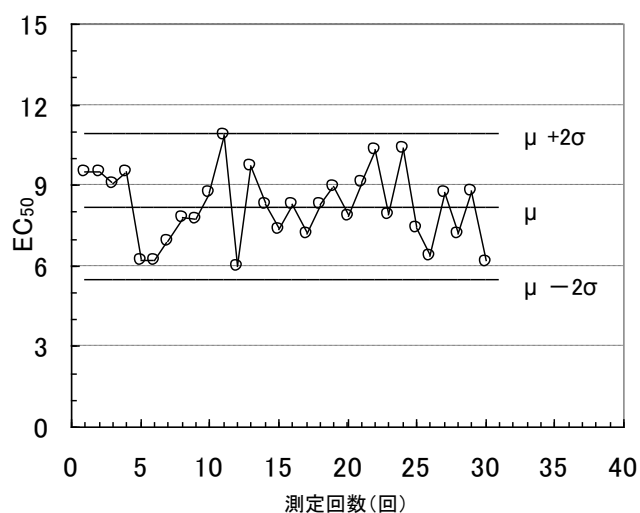



図 3-3-10 管理図例

5.3 測定試料の定量

通常、試料の RLU から、並行処理している操作ブランクの RLU を差し引いた総 RLU を求める。この総 RLU を 5.1 で求めた近似式に代入し、実測濃度を算出する。また、希釈試料の複数の水準が定量範囲に収まった場合、それぞれの希釈水準から求められた濃度を平均して実測濃度とする。

求めた濃度 X（ng/mL）から以下の式によって試料量あたりの実測濃度を求める。

濃度 X の求め方： $X = 10^{-\frac{1}{\gamma} ln\left\{\left(\frac{\alpha}{y-\beta}-1\right)/\beta\right\}}$

1) 排出ガス

$$C_S = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、Cs ： 排出ガス中の実測濃度(ng/m^{3}N)

X ： 希釈試料中実測濃度(ng/mL)

n ： 希釈倍率

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

V ： 試料ガスの採取量(m^{3}N)

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C ： 酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m^{3}N)

Os ： 排出ガス中の酸素の濃度(注 2)(%)

Cs ： 排出ガス中の実測濃度(ng/m^{3}N)

(注 2) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os=20 とする。

2) ばいじん及び燃え殻

$$C_W = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W}$$

ここに、C_w ： ばいじん及び燃え殻中の実測濃度(ng/g)

X ： 希釈試料中実測濃度(ng/mL)

n ： 希釈倍率

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

W ： ばいじん及び燃え殻試料の採取量(g)

６．検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲の確認

検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定値の定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限、20%以下となる上下 2 点間を定量範囲とする。
この標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認する。

1)　検出下限等算出用標準溶液の調製例

2,3,7,8-TeCDD の DMSO 標準溶液を用い、0(DMSO)、0.02、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10、20、30、50 及び 100pg/μL の DMSO 溶液を調製する。

2)　検出下限及び定量範囲の算出例

4.1～5.1 に準じて測定を行い、17 濃度水準の検量線を作成する。ただし、各濃度水準におけるウェル数は 5 以上とする。個々の RLU について、検量線から毒性等量（pg-TEQ/μL）を求め、濃度水準ごとに測定量の変動係数を算出し、精度プロファイルを作成する。

変動係数(CV%)が 30%となる点を検出下限、20%となる上下 2 点間を定量範囲とする。濃度水準ごとに 6 ウェルで測定した例を図 3-3-11 に示す。

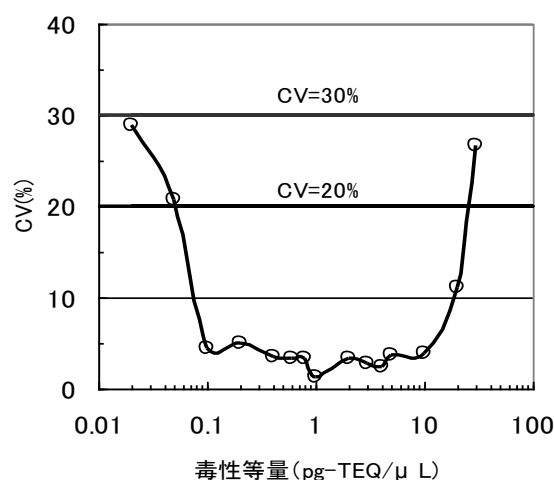



図 3-3-11　精度プロファイルの例

6.2　試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、標準物質における検出下限並びに定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

７．測定量（毒性等量）への換算

図 3-3-12 に、生物検定法によって測定された濃度の HRGC/HRMS 法によって求めた濃度に対する相関図を示す。現時点で相関図より近似式を求めた結果、排出ガスの場合 y=0.319x、ばいじん及び燃え殻の場合 y=0.390x となっている。従って、生物検定法で求めた実測濃度(ng/m^{3}N あるいは ng/g)を、排出ガスの場合、換算係数 0.319、ばいじん及び燃え殻の場合、換算係数 0.390 を乗じて測定量(毒性等量)を求める。なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

得られた換算係数が、第 6 節の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求める。残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作し、生物検定法における測定量（毒性等量）を求める。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）ならびに本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作し、それぞれの方法について測定量（毒性等量）を求める。

HRGC/HRMS 法により求めた毒性等量と生物検定法により求めた実測濃度の相関図を作成し、回帰直線の係数を換算係数とする。相関図の例を次節に示す。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

多数の排出ガス試料(この例では n=25。n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求め、HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-3-12 では Y/X の平均値である 0.319 を換算係数とした)。

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

複数のばいじん及び燃え殻試料(この例では n=44。n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-3-12 では Y/X の平均値である 0.390 を換算係数とした)。

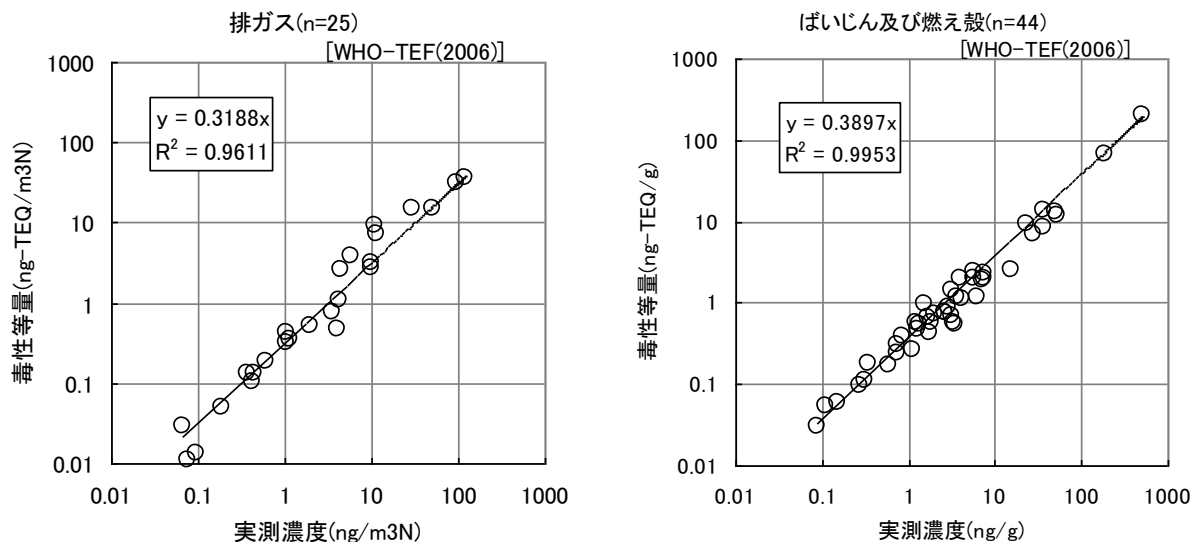



図 3-3-12　換算係数算出(例)
(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

その４　前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流法を利用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4ⅡE-luc を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第１の 4)

第１節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組み換え細胞 H4ⅡE-luc を用いたレポータージーンアッセイによる測定により定量する。測定方法のフローを図 3-4-1 に示す。

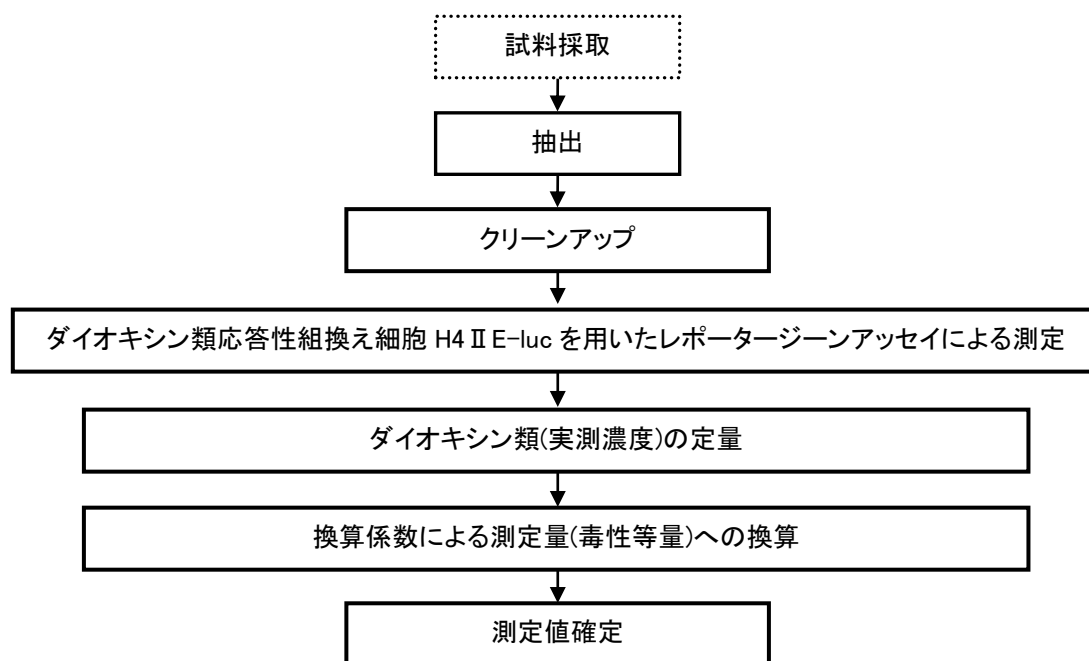



図 3-4-1　測定方法のフロー

第２節 用語の定義

1) **ルシフェラーゼ遺伝子**　Luciferase Gene。生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子。
2) **Ah 受容体**　Arylhydrocarbon Receptor。アリール炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。
3) **リガンド**　Ligand。タンパク質又は他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。受容体が鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応が引き起こされる。
4) **DRE**　Dioxin Responsive Element。ダイオキシン応答配列。ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分。
5) **CYP1A1**　Cytochrome P450。薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、

ダイオキシン類により誘導されることが知られている。

6) 継代培養　Subculture。保存細胞から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの。

7) コンフルエント　Confluent。細胞の密集生育状態。

8)　プラスミド　Plasmid。小型の環状 DNA 分子のこと。

9)　発光基質　生物発光反応の基質。

10)　精度プロファイル　精度確認用の標準溶液濃度と変動係数(CV%)との関連図。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V　：測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m^3N)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 5ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/m^3N)

抽出液を 40mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.05mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 12.1pg/ml、排出ガスの測定量への換算係数は 0.308 を用いた。

$$V = \frac{12.1 \times 0.308 \times 0.05}{1000} \times \frac{40}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.0044$$

2．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下にばいじん及び燃え殻試料における検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W ： 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pg/mL, DMSO 溶液中)

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数

v ： 測定用試料の液量(mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

C_{DL} ： 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 90mL に定容し、その抽出液から 30mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.05mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 12.1pg/ml、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数は 0.356 を用いた。

$$W = \frac{12.1 \times 0.356 \times 0.05}{1000} \times \frac{90}{30} \times \frac{1}{0.1} = 0.0065$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-4-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

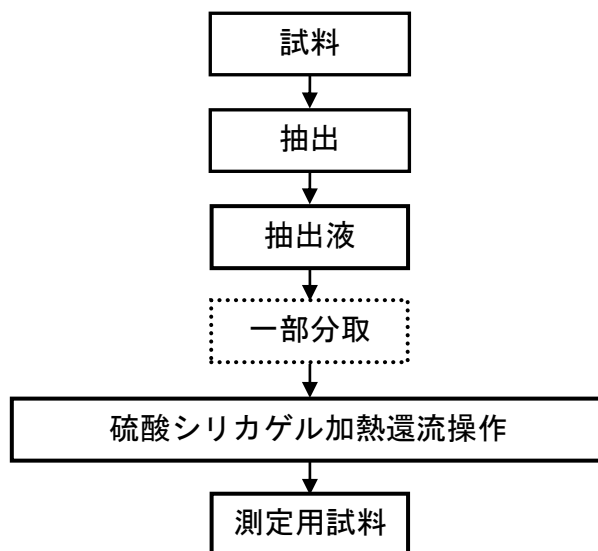



図 3-4-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　水　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの

2)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの

3)　トルエン　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの

4)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの

5)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの

6)　ジメチルスルホキシド(DMSO)　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)

7)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの

8)　塩酸　JIS K8180 に規定するもの、又は同等の品質のもの

9)　硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの

10)　ヘキサン洗浄水　1)の水を 6)のヘキサンで十分洗浄したもの

11)　シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

12)　硫酸(44%質量分率)シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

13)　ガラス繊維ろ紙　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

14)　窒素　JIS K01107 に規定するもの、又は同等の品質のもの

(注 1)ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるため、ロットの変更時等には十分注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がフッ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器、ロータリーエバポレーター、室素気流濃縮装置等。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 還流装置

80℃に温度調節可能な恒温水槽に還流用冷却管(球管)をセットしたもの。

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 3-4-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

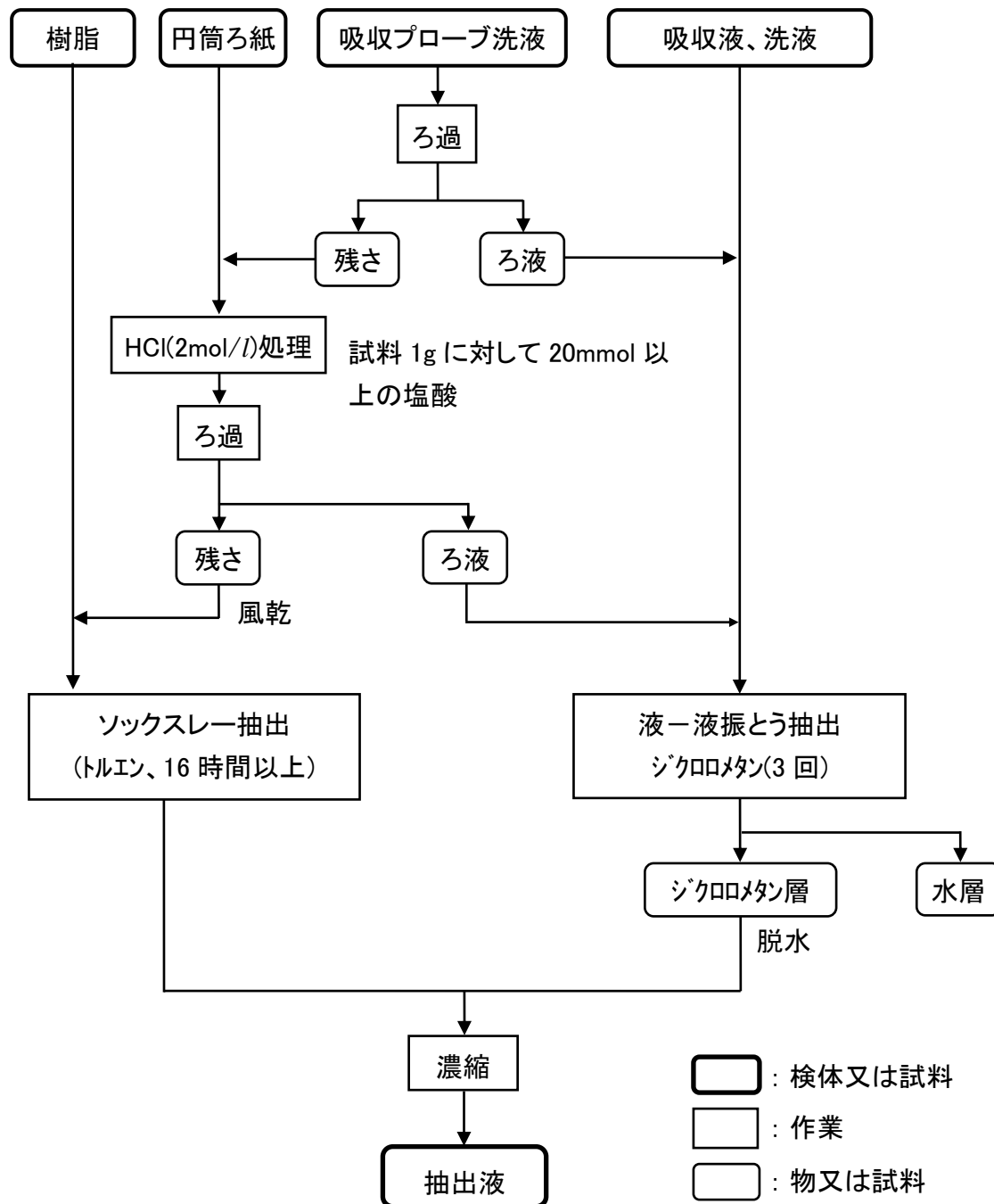



図 3-4-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。

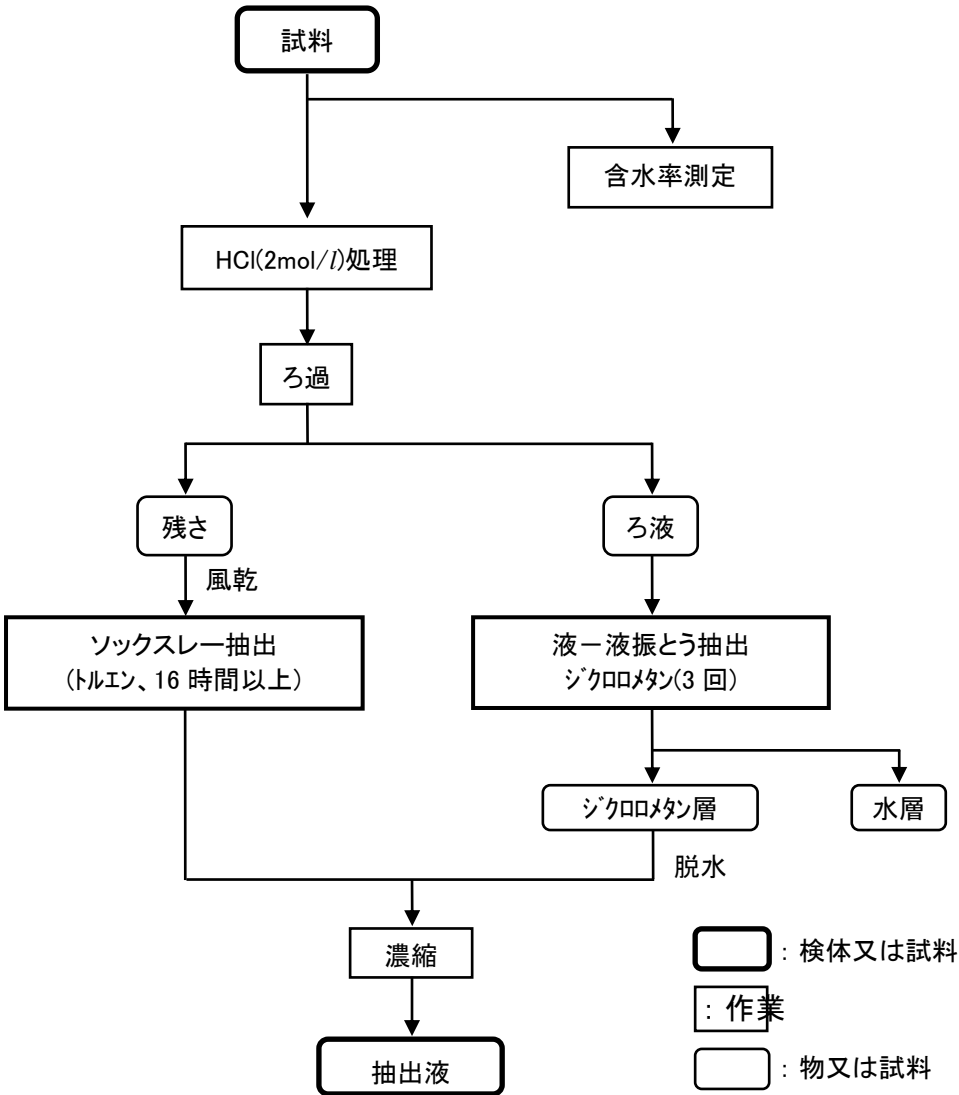
試料の適量を用いて、ダイオキシン類分析及び水分測定を行う。図 3-4-4 にばいじん及び燃え殻試料の

抽出液調製までのフローの例を示す。

図 3-4-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

4.3 クリーンアップ

図 3-4-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

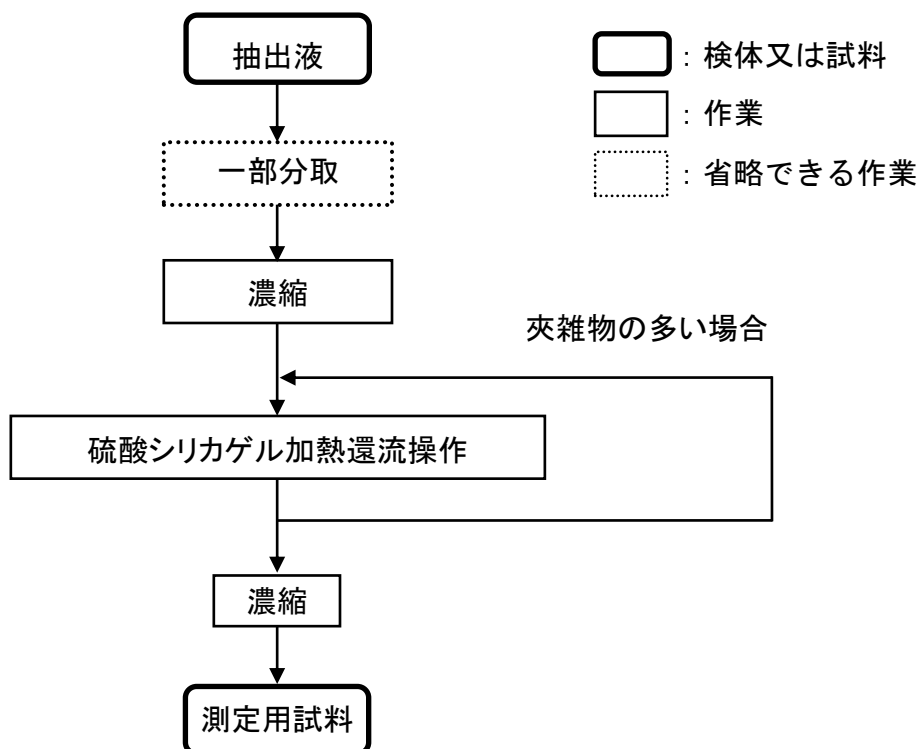



図 3-4-5　クリーンアップのフローの例

1)　抽出液の分取

抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から必要量を分取する。

2)　硫酸シリカゲル加熱還流の準備

夾雑物の少ない場合は三角フラスコに硫酸(44%質量分率)シリカゲル 20g を量り取り、ヘキサン 45mL 及び沸石を添加する。夾雑物が多い場合は硫酸(44%質量分率)シリカゲルとヘキサンを倍加する。

3)　硫酸シリカゲル加熱還流処理

(1) 抽出液を約 1mL まで濃縮して 2)に加え、ヘキサン 2mL で抽出液の容器を 2 回洗い込む。

(2) 冷却管にセットし、水温 80℃に維持したウォーターバスに三角フラスコを浸け、60 分間加熱還流を行う。

(3) 放冷後、濃縮容器にロートとろ紙をセットし、無水硫酸ナトリウム 5 g をろ紙底に添加し、試料をろ過する。

(4) ヘキサン 30mL を三角フラスコに注ぎ振り洗い、ろ過する。これを 2～3 回繰り返す。

4)　測定用試料の保存

(1) 3)の試料を、ロータリーエバポレーターで約 1mL まで濃縮し、試料識別ラベルを貼ったバイアルに移す。

(2) 濃縮液に固化、着色が認められた場合は少量のヘキサンで溶解後、3)の硫酸シリカゲル加熱還流処理を繰り返す。

(3) ヘキサンで濃縮容器を 2 回洗い込みながら、窒素気流濃縮装置により乾固させる。

(4) 乾固後、直ちに DMSO 50μL を添加し、試験管ミキサー等で撹拌する。

(5) 最終検液として冷蔵庫で保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4ⅡE－luc を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光量を発光光度計で測定することによりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の発光量から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4ⅡE－luc：レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、その上流域にダイオキシン類応答配列ＤＲＥを４個持つラットのシトクロムＰ450（ＣＹＰ１Ａ１）プロモーターを配置したプラスミド pGudLuc1.1 を、ラット肝がん細胞由来 H4ⅡE に導入したもの(注 2)。

(注 2) 引用文献：P.M.Garrison et al., Species-Specific Recombinant Cell Line as Bioassay Systems for the Detection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin like Chemicals,Fundam Appl Toxicol.1996 Apr;30(2):194-203

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1) **培地**　α-MEM、FBS(+10%体積分率)
2) **Fetal Bovine Serum**　-20℃凍結保存
3) **ハンクス平衡塩溶液(HBSS)**　室温保存
4) **トリプシン溶液**　0.05%、-20℃凍結保存
5) **リン酸緩衝生理食塩液(PBS(-))**　マグネシウム及びカルシウム不含
6) **ジメチルスルホキシド(DMSO)**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)
7) **細胞凍結用 DMSO**　エンドトキシン、ハイブリドーマ試験済み、滅菌済みのもの
8) **$CaCl_2$・$2H_2O$**　0.13g を 13)の水 100mL に溶かしたもの
9) **$MgCl_2$・$6H_2O$**　0.1g を 13)の水 100mL に溶かしたもの
10) **細胞凍結用保存液**　1)の培地と凍結保存用 DMSO を 4:1 で混合したもの
11) **標準物質**　2,3,7,8-TeCDD　(50μg/mL)
12) **ルシフェラーゼ定量キット**
13) **水**　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等の品質のもの
14) **炭酸ガス**
15) **液体窒素**

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1) **培養フラスコ**　75cm²、滅菌済み
2) **プラスチックピペット**　1mL、5mL、10mL、滅菌済み、使い捨てできるもの
3) **プラスチックチューブ**　15mL、50mL、滅菌済み、使い捨てできるもの
4) **凍結保存用バイアル**　滅菌済み
5) **96 ウェルマイクロプレート**　平底、細胞培養表面処理、滅菌済み
6) **48 ウェルマイクロプレート**　平底、滅菌済み
7) **連続分注ピペット**　5mL、25mL、滅菌済み
8) **マイクロピペット**　10μL、40μL、200μL、1000μL
9) **チップ**　50μL、250μL、1000μL、高圧蒸気滅菌可能なもの
10) **8 連ピペット**
11) **マルチプレートシール**
12) **リザーバー**　高圧蒸気滅菌可能なもの
13) **50mL シリンジ**　ポリプロピレン製、滅菌済み
14) **スパイナル針**　1.20×90mm、滅菌済み
15) **33mm シリンジフィルター**　孔径 0.22μm、滅菌済み
16) **安全キャビネット**　クラスⅡタイプ A
17) **インキュベーター**
18) **培養用倒立位相差顕微鏡**
19) **恒温水槽**
20) **プレートシェーカー**
21) **ルミノメーター**
22) **超低温冷凍庫(-80／-150℃)**
23) **液体窒素容器**
24) **高圧蒸気滅菌器**
25) **ミキサー**

３．細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の起眠

1) 培養フラスコ(75cm²)2 個に培地を 10mL ずつ移し、CO_2 5%、37℃の環境下のインキュベーターで 4 時間放置する。
2) 液体窒素保存容器から凍結保存用バイアルを取り出し、37℃の恒温水槽で、わずかに氷塊が残る程度まで融解する。
3) 1)のフラスコ内の培地 0.5mL を 1mL ピペットで 2)に添加し、穏やかに混合後、各フラスコの細胞濃度が異なるように細胞懸濁液を移す(通常は 1mL と 0.5mL)。
4) フラスコを数回傾けてなじませ、インキュベーターに移して CO_2 5%、37℃の環境下で培養する。
5) 培養フラスコ内に雑菌汚染がないことを確認できれば、継代を 3 代行った後、試験に使用しても良い。

6) 1),3)の操作は安全キャビネット内で無菌的に行う。

（注 3）安全キャビネット内で無菌操作を行う

3.2 細胞の継代

1) 培地、HBSS、トリプシン溶液を恒温水槽で 37℃に温める。

2) 培養フラスコをインキュベーターから取り出し、細胞観察を行う。

3) ピペットで培地を除去後、新しいピペットで HBSS を 5mL 添加して細胞接着面を洗浄し、HBSS を除去する。

4) ピペットでトリプシン溶液を 3mL 添加し、細胞接着面になじませた後、トリプシン溶液を除去する。

5) インキュベーター内でフラスコを 3 分間静置後、手のひらでフラスコの底面を軽くたたく。

6) 顕微鏡でフラスコ内の細胞が浮遊し、丸くなっていることを確認する。

7) ピペットで培地を 10mL 添加して混合・単細胞化し、細胞懸濁液を作製する。

8) 新しいフラスコに、細胞懸濁液と培地を併せて 10mL になるよう、培地と 7)の細胞懸濁液を適量(培養の日数により、細胞懸濁液の量を調節する)移す。

9) インキュベーターに 8)のフラスコを移し、CO_2 5%、37℃の環境下で２～４日培養する。

10) 細胞の継代操作は 80 代まで目安とし、期限前であっても測定に支障が生じる等、細胞に問題があると考えられる場合にはそれ以後の継代には使用せず廃棄する(注 4)。

11) 3),4),7),8）の操作は安全キャビネット内で無菌的に行う。

（注 4）測定に支障が生じる場合とは、細胞の活性低下(検量線作成時の DEMS のみと 300pM/well の発光量の比が 8 以下となった時)、コンタミネーション等を指す

3.3　細胞の保存

1) 90％コンフルエントに達したフラスコ 5 個について、3.2 の 1)～6)の操作を行う。

2) 1 番目のフラスコに 5mL の培地を添加して細胞を剥がして懸濁し、その細胞懸濁液全量を 2 番目のフラスコに移す。

3) 同様に 2 から 3、3 から 4、4 から 5 番目のフラスコへと細胞懸濁液を移し、5 番目のフラスコにフラスコ 5 個分の細胞を集め、混合・単細胞化する。

4) 10 本の凍結保存用バイアルにプラスチックピペットで 3)の細胞懸濁液を分注し、10 分間静置する。

5) 凍結保存用培地(細胞保存用 DMSO：培地＝１：４)を調製し、穏やかに滴下して 4)に添加する。

6) の凍結保存用バイアルを数回反転させて内容物を混合し、-80℃の冷凍庫で 1 日凍結させる。

7) １日-80℃で凍結した凍結保存用バイアルを液体窒素保存容器または超低温冷凍庫(-150℃)に移し、保管する。細胞を短期間保管するのであれば、-80℃の冷凍庫でも良い。

8) 2)、3)の 5 個のフラスコについて、再度 2)、3)と同様の操作を行う。

9) コンタミネーションの有無の確認を行うため、8)の培地、凍結保存用培地及び 1 日以上液体窒素中で保存した細胞を解凍し、インキュベーターに移して CO_2 5%、37℃の環境下で培養する。

10) 1),2),3),4),5),8）の操作は安全キャビネット内で無菌的に行う。

４．測定操作

4.1 細胞のマイクロプレートへの播種

1) インキュベーターからコンフルエントに達した培養フラスコを取り出し、3.2 の 1)～7)の操作を行う。

2) 細胞懸濁液を 50mL プラスチックチューブに移し、同量（10 mL）の培地をピペットで添加し、混合・単細胞化する（注 5)。

3) PBS(-)、HBSS、滅菌水等をリザーバーに移し、200□L ずつマイクロプレートの外側 1 周(36 ウェル)に添加する（注 6)。

4) 連続分注ピペットで 2)の細胞懸濁液 100μL を 3)の残りの内側 60 ウェルに添加する。

5) マイクロプレートをインキュベーターに移し、CO_2 5%、37℃の環境下で 16～24 時間培養する。

6) 1),2),3),4）の操作は安全キャビネット内で無菌的に行う。

（注 5）細胞の量によっては添加する培地の量を増減しても良い。
（注 6）プレートの外周部分のウェルは、培養中に培地の蒸発等の影響を受けやすいため、原則として定量には使用しない。

4.2 曝露

1) 測定用試料(DMSO 溶液)を、測定値が定量範囲内に入るよう適宜 DMSO で希釈し、3～12 水準の希釈系列試料を調製する。試料の希釈例を 表 3-4-1 に示す。

2) 48 ウェルプレートに培地 500μl を入れ、DMSO(ブランク)、検量線作成用標準液及び 1)で調製した試料を 8μl を加えてよく混合する。検量線作成用標準液の濃度調製例を 表 3-4-2 に示す。

3) 16～24 時間培養したマイクロプレートの内側 60 ウェルに、100μL、3 ウェルずつ 2)を添加する(注 7)。

4) 再度マイクロプレートをインキュベーターに戻し、CO_2 5%、37℃の環境下で約 24 時間培養する。

5) 1),2),3）の操作は安全キャビネット内で無菌的に行う。

（注 7）検量線作成用標準液はプレート毎に曝露・測定する。レイアウト例を 図 3−4−6 に示す。

表 3-4-1　試料の希釈例

試料	希釈元	分取量(μL)	DMSO 分注量(μL)
原液	原液	(50)	0
2 倍希釈	原液	25	25
6 倍希釈	2 倍希釈	15	30
20 倍希釈	2 倍希釈	10	90
60 倍希釈	6 倍希釈	10	90

表 3-4-2　検量線作成用標準液の濃度調製例

終濃度(pM/well)	希釈前(nM)	希釈前(pg/mL)
0.3	0.0375	12.075
1	0.125	40.25
3	0.375	120.75
10	1.25	402.5
30	3.75	1207.5
100	12.5	4025
300	37.5	12075

DMSO	STD-1	STD-2	STD-3	STD-4	STD-5	STD-6	STD-7	試料 2-6	試料 2-5
試料 1-1	試料 1-2	試料 1-3	試料 1-4	試料 1-5	試料 1-6	試料 2-1	試料 2-2	試料 2-3	試料 2-4

図 3-4-6　96 ウェルプレート上でのレイアウト例(注 6)

4.3 ルシフェラーゼ活性の測定

1) PBS(+)の調製

$CaCl_2$溶液及び$MgCl_2$溶液を、PBS(-)：$CaCl_2$溶液：$MgCl_2$溶液＝8：1：1 の割合で混合する(注 8)。

(注 8) PBS(+)は沈殿が生成しやすいため、使用直前に調製する

2) ルシフェラーゼ活性の測定

(1) 約 24 時間曝露を行ったマイクロプレートをインキュベーターから取り出し、プレートを裏返して、マイクロプレート内の培地を除去する。

(2) マイクロプレートの内側 60 ウェルに、8 連ピペットで PBS(+)を 50μL ずつ添加し、デカンテーションで除去する。

(3) 再度マイクロプレートの内側 60 ウェルに、8 連ピペットで PBS(+)を 50μL ずつ添加する。

(4) ルシフェラーゼ定量キットの発光基質を緩衝液で溶解し、(3)のマイクロプレートの内側 60 ウェルに、8 連ピペットで 50μL ずつ添加する（図 3-4-6 参照)。

(5) のマイクロプレートにマルチプレートシールを貼る。

(6) 遮光して室温で 30 分静置後、ルミノメーターで発光量の測定を行う。

5．定量

5.1 検量線の作成

検量線はプレート毎に作成する。

1) ルミノメーターで測定した各 3 ウェルの検量線作成用標準液の発光量平均値を DMSO ブランクの発光量平均値で差し引いて校正する。

2) 検量線作成用標準液の濃度(pM/well)と校正済み発光量平均値について以下の式にカーブフィットさせ、a_0、a_1、a_2 の各パラメーターを得る。

$$y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x}{a_1}\right)^{a_2}}$$

ここに、　y　：　測定値(RLU)

　　　　　x　：　検量線作成用標準液濃度(pM/well)

　　　　　a_0　：　最大 RLU

　　　　　a_1　：　曲線の EC_{50}

　　　　　a_2　：　曲線のスロープ

3) 得られたパラメーターから検量線を作成する。

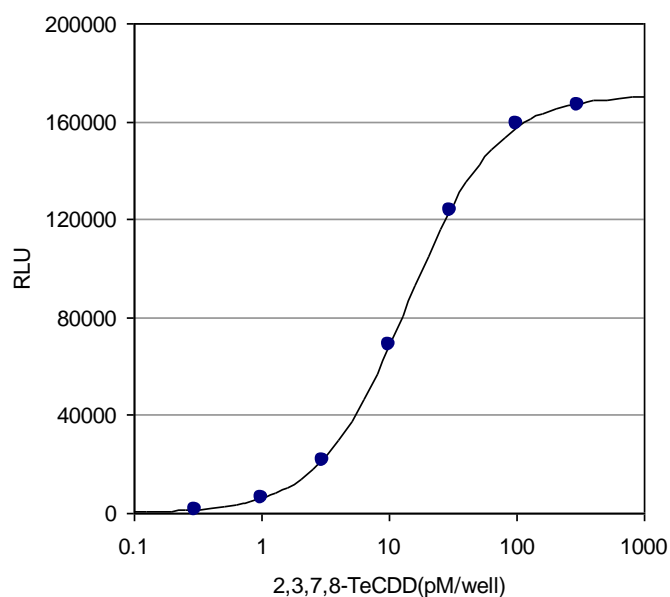



図 3-4-7　検量線例

5.2 検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、検量線作成用標準液の測定操作により得られたデータから測定量(毒性等量)を求め、管理図に記録し保存する。

3pM/well 及び 1pM/well 検量線作成用標準液の検量線へのフィッティング値(pM/well)を求め、管理図にプロットする。管理図による処置基準は管理限界(μ±2σ)からの逸脱状況に応じて以下の通りとする。

1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、必要に応じ再測定を行う。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。3pM/well の管理図例を 図 3-4-8 に示す。

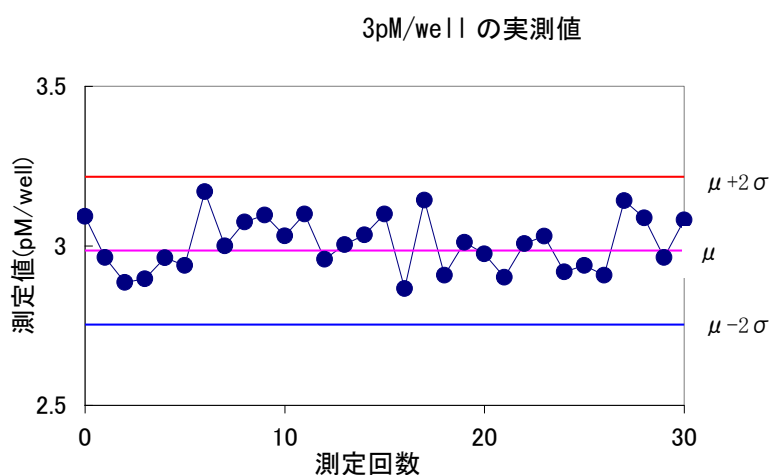



図 3-4-8　3pM/well の管理図例

5.3 測定試料の定量

1) 5.1 の式に、検量線作成用標準液測定値から計算して得られたパラメーターを代入してプレート毎の検量線近似式を求める。

2) DMSO 校正後の各濃度試料(各試料の希釈列)の発光量平均値を代入してウェル中の 2,3,7,8-TeCDD 換算濃度を算出する(pM/well)。

3) で得られた濃度に次式から、各濃度試料の実測値を算出する(pg/g、pg/m^{3}N)。

実測値(pg/g、pg/m^{3}N)＝(ウェル中の濃度(pM/well)×125 倍*×検液の希釈倍率×最終検液量(μl)×322(2,3,7,8-TeCDD 分子量)×10^{-6})-操作ブランク(pg/最終検液))/試料処理量(pg/g、pg/m^{3}N)

＊125 倍:アッセイに添加した試料濃度からウェルに添加するまでに 125 倍の希釈を行っている。

4) 試料の定量値の確定は曝露した各濃度試料のうち、3pM の場合のデータを用いて行う(注 9)。3)で得られた数値のうち、濃度が 3pM/well 前後に相当する 2 点を以下の式に代入し、算出する(注 10)。

$$y = \frac{B-A}{b-a} \times (3-b) + B$$

ここで、y：試料の実測値(pg/g、pg/m^{3}N)

a：3pM/well より低濃度側の濃度(pM/well)

A：3pM/well より低濃度側の実測値(pg/g、pg/m^{3}N)

b：3pM/well より高濃度側の濃度(pM/well)

B：3pM/well より高濃度側の実測値(pg/g、pg/m^{3}N)

(注 9) 3pM/well 前後に相当する 2 点の希釈濃度試料がない場合は、再度希釈しアッセイを行う。
(注 10) 得られた値の単位は pg/m^{3}N 又は pg/g であるため、ng/m^{3}N 又は ng/g に換算する

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C ： 酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m^{3}N)

Os： 排出ガス中の酸素の濃度(注 11)(%)

Cs： 排出ガス中の実測濃度(ng/m^{3}N)

(注 11) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os=20 とする。

６. 検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲の確認

検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定量の定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限、20%以下となる上下 2 点間を定量範囲とする。

この標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合(機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等)にも、確認する。

1) 検出下限算出用標準溶液の調製例

2,3,7,8-TeCDD の標準液(DMSO 溶液)を用い、0(DMSO ブランク)、0.1、0.3、0.5、1、3、5、10、30、50、100、150、300pM/well となるように DMSO で希釈を行う。

2)　検出下限及び定量範囲の算出例

4.1～5.1 に準じて測定を行い、12 濃度水準の検量線を作成する。ただし、各濃度水準におけるウェル数は 5 以上とする。ここの RLU について、検量線から濃度(pM/well)を求め、濃度水準ごとに測定量の変動係数を算出し、精度プロファイルを作成する。

変動係数(CV%)が 30％となる点を検出下限、20％となる上下 2 点間を定量範囲とする。濃度水準ごとに 5 ウェルで測定した例を図 3-4-9 に示す。

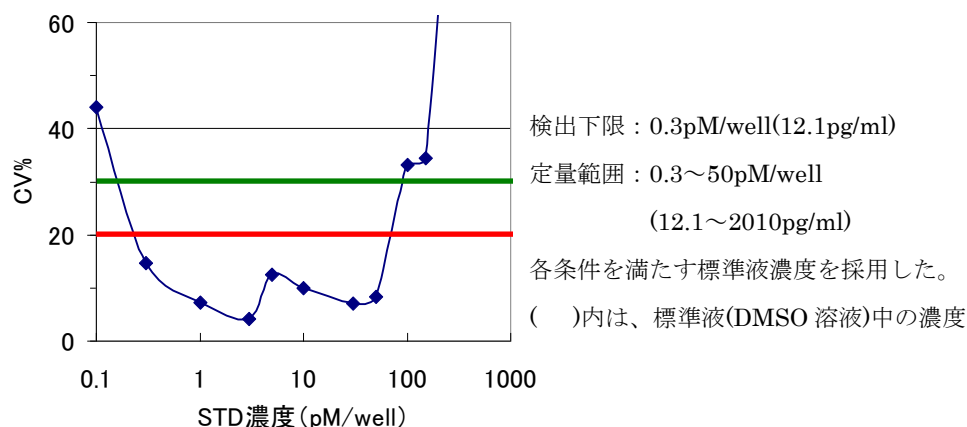



図 3-4-9　精度プロファイルの例

6.2 試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料と前処理を経た最終検液量の数値と、標準物質における検出下限並びに定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

７．測定量（毒性等量）への換算

図 3-4-10 に、生物検定法によって測定された濃度の HRGC/HRMS 法によって求めた濃度に対する相関図を示す。現時点で相関図より近似式を求めた結果、排出ガスの場合、 y ＝0.308x、ばいじん及び燃え殻の場合、 y ＝0.356x となっている。したがって、生物検定法で求めた実測濃度(ng/g、ng/m^3N)を、排出ガスの場合、換算係数、ばいじん及び燃え殻の場合、換算係数を乗じて測定量(毒性等量)を求める。なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量(毒性等量)と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合(機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等)にも、確認を行う。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

得られた換算係数が第 6 節の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い。その結果及び講じた措置を記録する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い、抽出までを行った抽出試料(ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない)を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量(毒性等量)を求める。残りは本法第 5 節 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作し、それぞれの方法について測定量(毒性等量)を求める。

HRGC/HRMS 法により求めた毒性等量と生物検定法により求めた実測濃度の相関図を作製し、回帰直線の係数を換算係数とする。相関図の例を次節に示す。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

多数の排出ガス試料(この例では n=54、n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれの実測濃度、毒性等量を求め、HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。
2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-4-10 では Y/X の平均値である 0.308 を換算係数とした)

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

多数のばいじん及び燃え殻試料(この例では n=41、n=20 以上が望ましい)について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。
2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図 3-4-11 では Y/X の平均値である 0.356 を換算係数とした)。

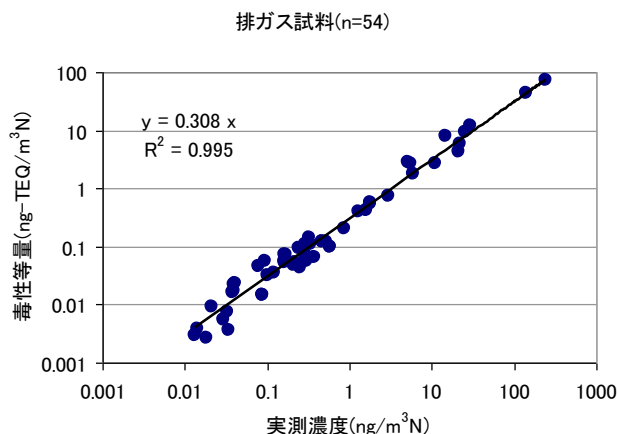



図 3-4-10 換算係数算出(例)
(排出ガス)

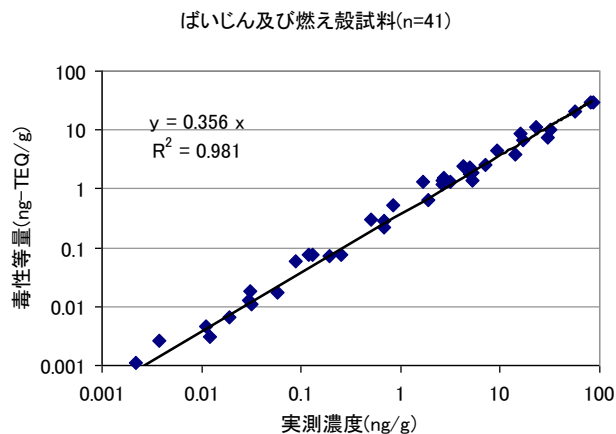



図 3-4-11 換算係数算出(例)
(ばいじん及び燃え殻)

その５　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR-EcoScreen を用いたレポータージーンアッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第１の 5)

第１節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR-EcoScreen を用いたレポータージーンアッセイによる測定により定量する。測定方法のフローを図 3-5-1 に示す。

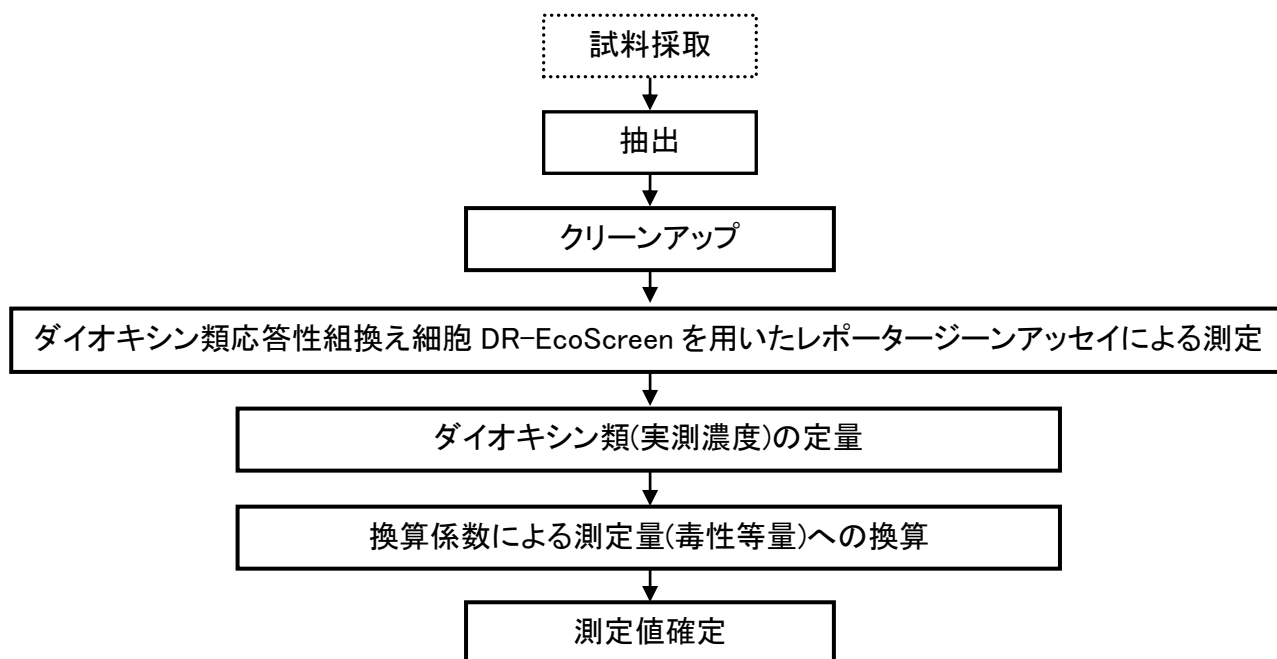



図 3-5-1　測定方法のフロー

第２節 用語の定義

1) **Ah 受容体**　Ah Receptor、Arylhydrocarbon Recepto。アリール炭化水素受容体。特異的な細胞外シグナル伝達分子（リガンド）に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。
2) **リガンド**　Ligand。タンパク質または他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。受容体が鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応が引き起こされる。
3) **ルシフェラーゼ遺伝子**　Luciferase Gene。生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子。
4) **CYP1A1**　Cytochrome P450。薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、ダイオキシン類により誘導されることが知られている。
5) **DRE**　Dioxin Responsive Element。ダイオキシン応答配列。ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分。

6) **プラスミド**　Plasmid。小型の環状 DNA 分子のこと。

7) **継代培養**　Subculture。保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの。

8) **発光基質**　生物発光反応の基質。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるように設定しなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V　：　測定に必要な最小の試料ガスの量（m^3N）

Q_{DL}　：　標準物質における検出下限（pg/mL, DMSO 溶液中）

k　：　測定量（毒性等量）への換算係数

v　：　測定用試料の液量（mL）

V_E　：　抽出液量（mL）

V_E'　：　抽出液分取量（mL）

C_{DL}　：　必要となる試料ガスにおける検出下限（ng-TEQ/m^3N）

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/m^3N）

抽出液を 10mL に定容し、その抽出液から 5mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 10pg/mL、排出ガスの測定量への換算係数は 0.2057 を用いた。

$$V = \frac{10 \times 0.2057 \times 1}{1000} \times \frac{10}{5} \times \frac{1}{0.17} = 0.024$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W: 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量（g）

Q_{DL}： 標準物質における検出下限（pg/mL, DMSO 溶液中）

k ： 測定量（毒性等量）への換算係数

v ： 測定用試料の液量（mL）

V_E ： 抽出液量（mL）

V_E' ： 抽出液分取量（mL）

C_{DL} ：必要となるばいじん及び燃え殻における検出下限（ng-TEQ/g）

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）3 ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1 ng-TEQ/g）

抽出液を 10mL に定容し、その抽出液全量を用いてクリーンアップを行い、最終的に 1mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 10pg/mL、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数はそれぞれ 0.2759 及び 0.2069 を用いた。

(1) ばいじん

$$W = \frac{10 \times 0.2759 \times 1}{1000} \times \frac{10}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.028$$

(2) 燃え殻

$$W = \frac{10 \times 0.2069 \times 1}{1000} \times \frac{10}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.020$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-5-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

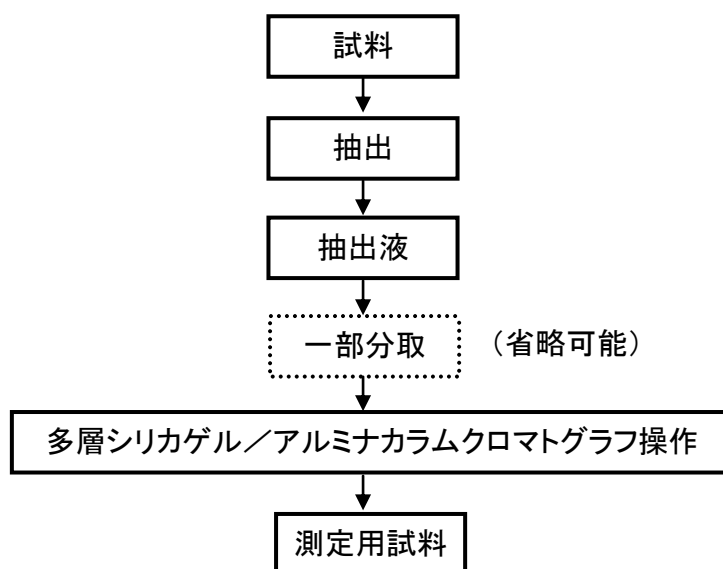



図 3-5-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　水　JIS K0557 に規定する A4（又は A3）の水
2)　メタノール　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4)　トルエン　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
7)　デカン　測定に支障のない品質のもの
8)　ジメチルスルホキシド (DMSO)　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの（注１）
9)　塩酸　JIS K8180 に規定するもの、又は同等の品質のもの
10)　硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
11)　硝酸銀　JIS K8550 に規定するもの、又は同等の品質のもの
12)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
13)　ヘキサン洗浄水　1）の水を 6）のヘキサンで十分洗浄したもの
14)　シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

15) 硫酸（44%質量分率）シリカゲル JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

16) 硝酸銀 (20%質量分率) シリカゲル 14) のシリカゲル 100 g に対して 11)の硝酸銀で調製した硝酸銀溶液 (625 g/L) 40 mL を加えた後、ロータリーエバポレータで水分を完全に除去する。硝酸銀シリカゲルは、調製後、密閉できる着色容器に入れ、デシケーター中に保存する。

17) アルミナ JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもので、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているもの

18) 窒素 JIS K1107 に規定する高純度窒素 1 級

19) ガラスウール JIS K8251 に規定するもの、又は同等の品質のもの

20) ガラス繊維ろ紙 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

（注１）ジメチルスルホキシド（DMSO）の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がフッ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 高速溶媒抽出装置

ダイオネクス製 ASE-200 又はこれと同等品。ASE 用の器具一式 (セルボディー、セルエンドキャップアセンブリ、溶媒ボトル、捕集ボトルアセンブリ、コンプレッサー等)

3.3 ソックスレー抽出器

JIS R3505 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 濃縮器

クデルナーダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない。

3.5 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径 14mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.6 アルミナカラムクロマト管

内径 6mm、長さ 50mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.7 ヒーター

カラムクロマト管を包み込み 100℃程度まで加熱することができるもの

3.8 送液ポンプ

流速の調節が毎分 0.1 ～ 10 mL の範囲内で可能であって、流速の変動が±2%以内のもの

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2　抽出

1)　排出ガス

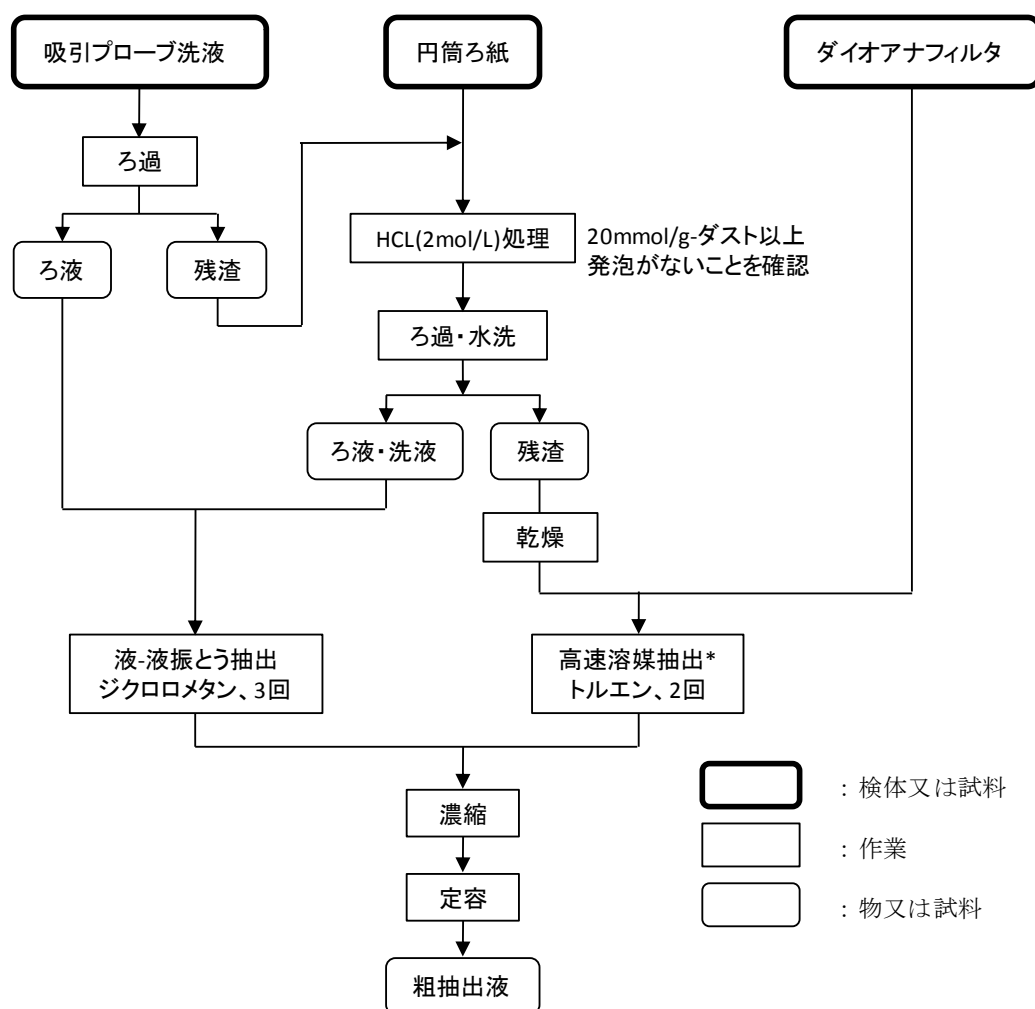
JIS K0311 6.4 に準拠し、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 3-5-3 に JISⅡ形装置を用いて採取した排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

*：高速溶媒抽出をソックスレー抽出（トルエン、16 時間以上）に代えることも可能

図 3-5-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置時間	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

2) ばいじん及び燃え殻

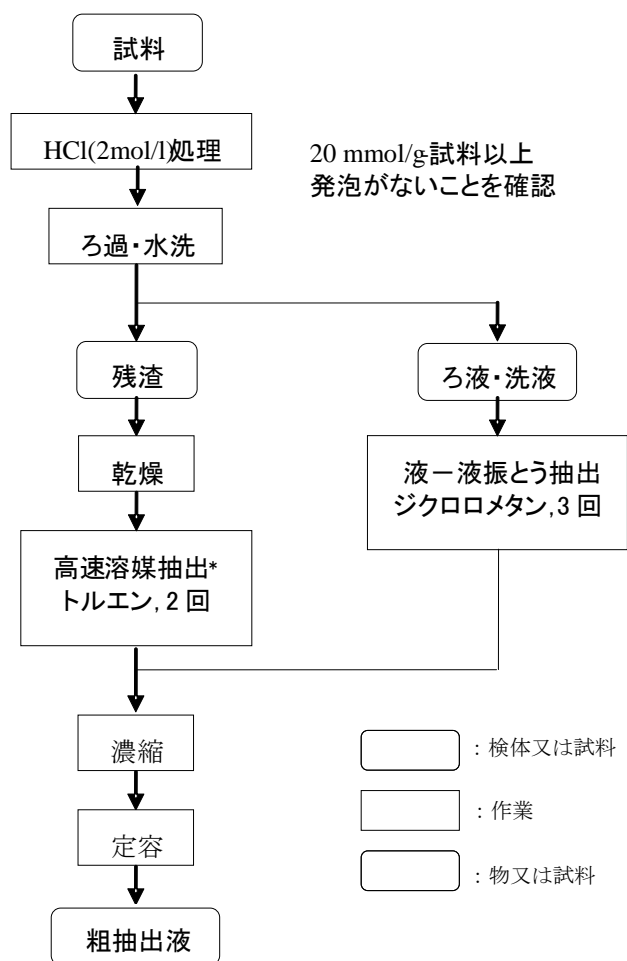
平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2) 又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 3-5-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

*：高速溶媒抽出をソックスレー抽出（トルエン、16 時間以上）に代えることも可能

図 3-5-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置時間	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

4.3　クリーンアップ

図 3-5-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

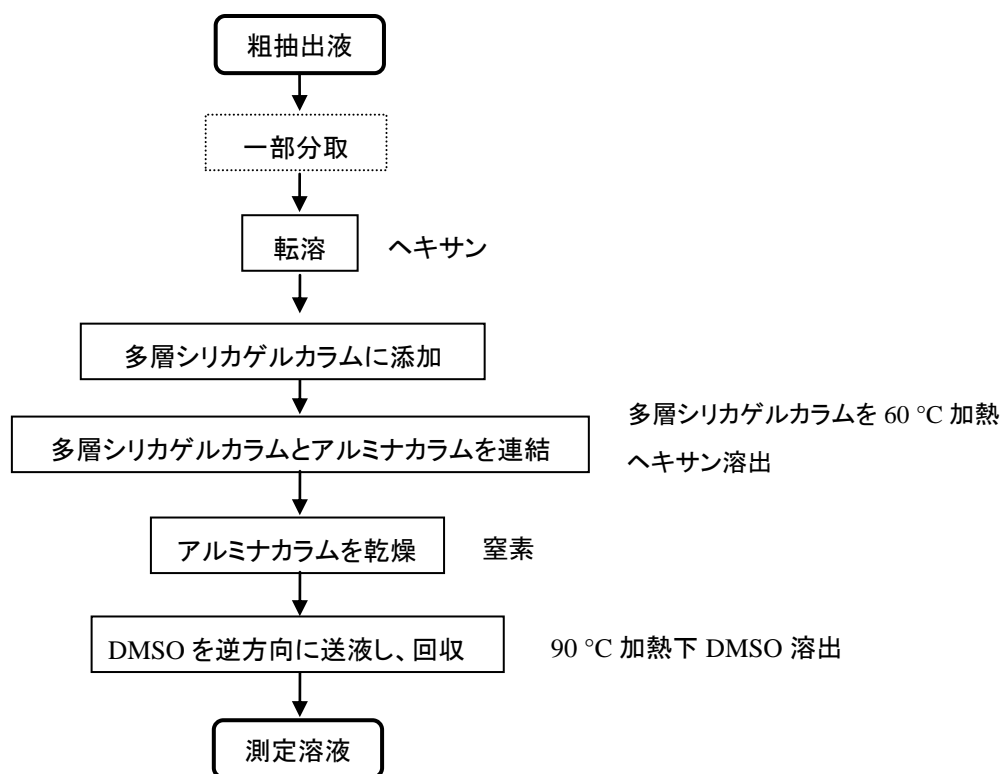



図 3−5−5　クリーンアップのフローの例

1)　抽出液の分取

(1)　抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。排出ガスについては 1.0m³N 相当量、ばいじん及び燃え殻については 1.0g 相当量の抽出液を 1 回のクリーンアップの目安とする。

(2)　あらかじめ、デカン 0.4 mL を入れた受器に適量の抽出液を入れ、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この濃縮液に適当量のヘキサンを加え、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この操作を 3 回程度繰り返し、トルエンを除去する。その後、次に示す多層シリカゲルカラムーアルミナカラム操作によってクリーンアップを行う。

2)　精製カラムの作製

(1)　多層シリカゲルカラム

3.4 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、シリカゲル 2.3g、硫酸（44%質量分率）シリカゲル 10.4g、シリカゲル 0.2g、硝酸銀（20%質量分率）シリカゲル 3.6g、シリカゲル 1.5g を順次充填する。このカラムを図 3-5-6 に示す。

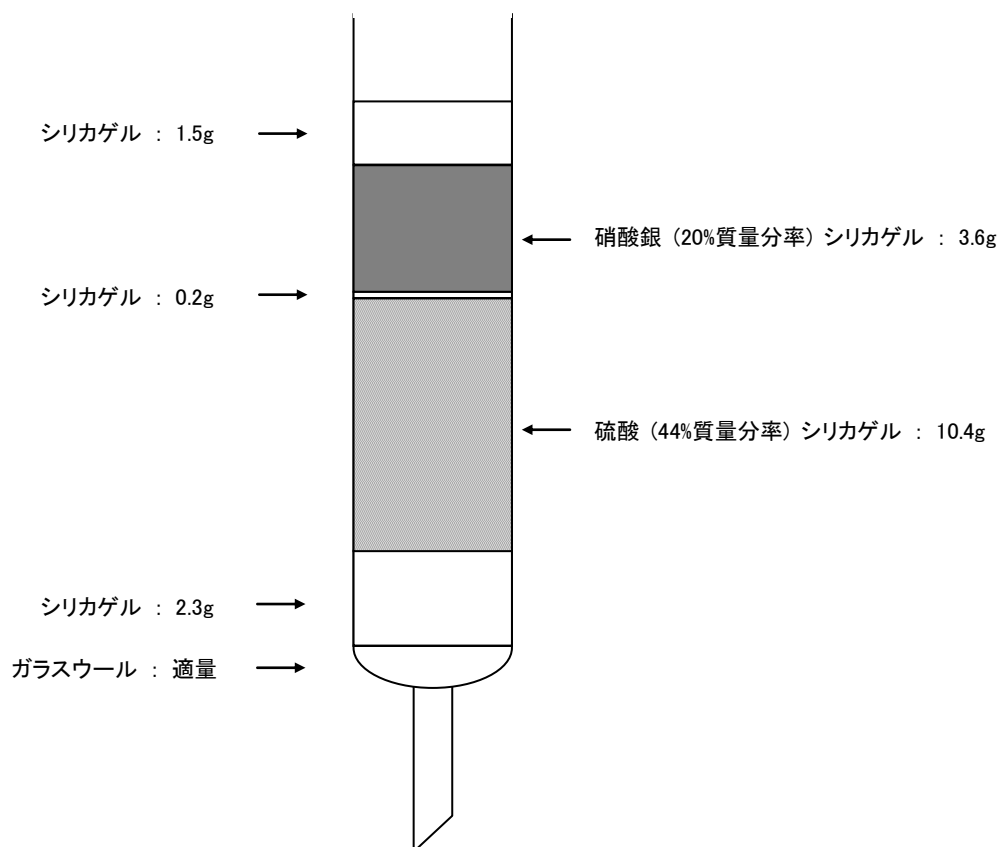



図 3-5-6　多層シリカゲルカラムの例

(2)　アルミナカラム

3.5 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、アルミナ 1.0g 程度充填し、その上からガラスウールを詰める。このカラムを図 3-5-7 に示す。

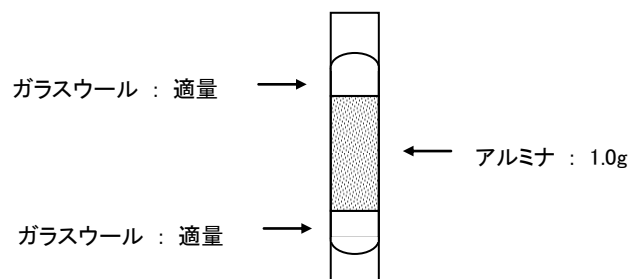



図 3−5−7　アルミナカラムの例

3)　クリーンアップ操作

(1) 図 3-5-8 に示す様に、2) の(1)多層シリカゲルカラム、(2)アルミナカラムを連結し、多層シリカゲルカラムを構成する上端のシリカゲル、硝酸銀シリカゲル及び硫酸シリカゲルの上半分の部分を覆うようにヒーターをセットする。

(2) 濃縮した試料にヘキサンを加え、多層シリカゲルカラムに添加する。添加する試料の液量は容器の洗液を合わせて最大 5mL までとする。

(3) ヒーターにより 60℃で 10 分間カラムを加熱する。

(4) 60℃加熱下、ヘキサン 85 mL を送液（2.5 mL/min）する。

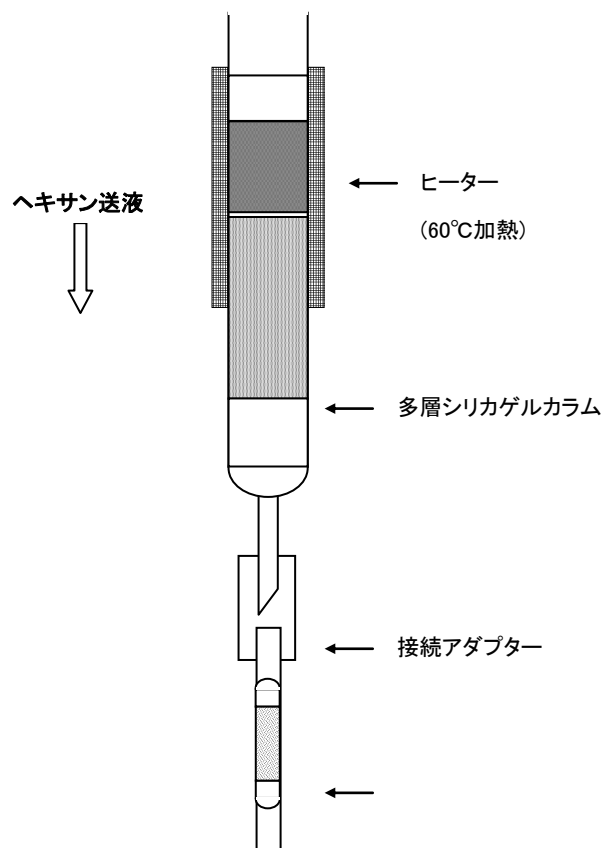



図 3-5-8　多層シリカゲルカラムとアルミナカラムの組み立て例

4)　溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3）の(4)の操作後、アルミナカラムに窒素を通じ、ヘキサンを除去する。

(2) アルミナカラムを包み込むようにヒーターをセットし、90℃で 10 分間加熱する。

(3) 90℃加熱下、3）の(4)のヘキサンの送液方向とは逆方向に、即ちアルミナカラム下端側から DMSO 2.5mL を送液（2.5mL/min）し、上端側から溶出する DMSO 溶液約 1mL を予め秤量済みのバイアル瓶に回収する。図 3-5-9 にアルミナカラムを反転させない場合の操作例を示した。

(4) 回収後、バイアル瓶を秤量し、密栓後、室温で暗所に保存する。秤量の差分を DMSO 定容量とする。

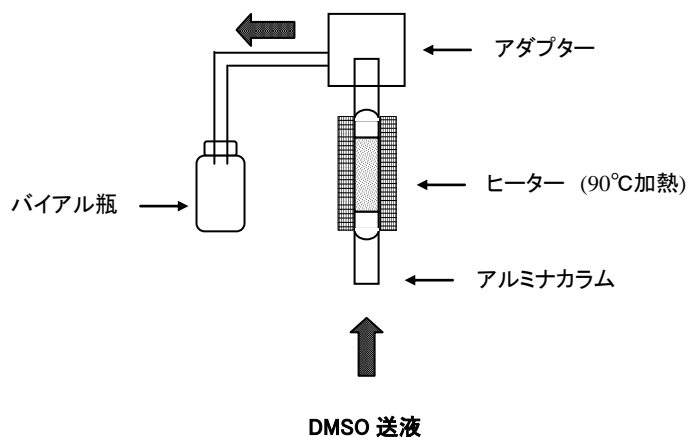



図 3-5-9　アルミナカラムを反転させない場合の DMSO への置換操作の例

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR－EcoScreen を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光量を発光光度計で測定することによりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の発光量から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 DR－EcoScreen：レポーター遺伝子としてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用い、その上流域に生体異物応答配列ＸＲＥを７個持つマウスのシトクロム P450（CYP1A1）プロモーターを配置したプラスミド pIND－GCDR7 を、マウス肝がん細胞由来 Hepa－1c1c7 に導入したもの(注 1)。

（注 1）引用文献：S. Takeuchi, et al., In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. Chemosphere, 74:155-165 (2008)

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1) **培地（αMEM）**　炭酸水素ナトリウム含有、L-グルタミン不含、滅菌及びエンドトキシンテスト済、冷蔵保存
2) **Fetal Bovine Serum（FBS）**　56℃、30 分間非働化処理済、-20℃凍結保存
3) **L-グルタミン**　200mM、滅菌及びエンドトキシンテスト済、0℃以下保存
4) **ペニシリン・ストレプトマイシン**　10000units ペニシリン・10mg/mL ストレプトマイシン、滅菌及びエンドトキシンテスト済、0℃以下保存

5) **Hygromycin B**　滅菌済、原液濃度 50mg/mL、冷蔵保存

6) **継代用培養液**　1)の 500mL、2)の 25mL、3)の 10mL、4)の 5mL、5)の 1.5mL を混合したもの、冷蔵保存

7) **アッセイ用培養液**　1)の 500mL、2)の 25mL、3)の 10mL、4)の 5mL を混合したもの、冷蔵保存

8) **ルシフェラーゼアッセイキット**　ホモジニアス長時間発光タイプ

9) **標準物質**　2,3,7,8-TeCDD（50μg/mL DMSO）

10) **炭酸ガス**　CO_2 99.5%

11) **ジメチルスルホキシド（DMSO）**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの（注 2）

12) **トリプシン/EDTA 溶液**　0.25% トリプシン／1mM EDTA 溶液

13) **トリパンブルー液**　0.4% 溶液

14) **細胞凍結用保存液**　培地 34mL に DMSO 6mL 加え、シリンジフィルタ（孔径 0.2μm）を用い、ろ過滅菌を行ったもの

（注 2）　ジメチルスルホキシド（DMSO）の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時には十分注意する。

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1) **培養マイクロプレート**　96 ウェル平底、白色プレート、滅菌済のもの

2) **培養フラスコ（25 cm^2）**　滅菌済のもの

3) **ピペット**　10mL 及び 5mL、滅菌済のもの

4) **遠心管（コニカルチューブ）**　ポリプロピレン製、50mL 及び 15mL、滅菌済のもの

5) **マイクロピペット用滅菌チップ**　200μL、1000μL、滅菌済のもの

6) **マイクロピペット用チップ**　200μL

7) **マイクロピペット**　20μL、200μl、1000μL

8) **12 あるいは 8 チャンネルマイクロピペット**

9) **ピペットエイド**

10) **安全キャビネット**　クラスⅡA タイプ

11) **インキュベーター**　37℃恒温、飽和湿度、5%CO_2

12) **ヒートブロック**

13) **遠心分離機**　100×g で遠心分離できるもの

14) **試験管ミキサー**

15) **血球計算盤**

16) **光学顕微鏡**

17) **カウンター**

18) **ラウンドチューブ**　ϕ12×75mm、ポリスチレン製、滅菌済みのもの

19) **マイクロプレートミキサー**

20) **ルミノメーター**　マルチウェル発光プレートリーダー

21) **細胞凍結保存用バイアル**　滅菌済みのもの

22) **ディープフリーザー**　–80℃

23) **リザーバー**

３．細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の起眠

1) 凍結保管箱からダイオキシン類応答性組換え細胞 Hepa1c1c7 の入った凍結保存用バイアルを取り出し、37℃で解凍する。
2) 15mL 遠心管にバイアルの内容物と継代用培養液 5mL を混和し（注 3)、遠心分離機を用いて 100xg で遠心する。
3) 上清を捨て、沈降した細胞に培養液 10mL を加えて混和し、培養フラスコに移す（注 3)。
4) 培養フラスコをインキュベーターに入れ、5 時間程度培養する。
5) 培養フラスコをインキュベーターから取り出し、培養液を取り除き、新しい継代用培養液を 5 mL 加えた（注 3）後、インキュベーターに入れ、２～３日間培養する。
6) 継代操作を繰り返し、細胞が安定して増殖するようになりに、細胞に異常がないことを確認した上で測定に使用する。

（注 3） 安全キャビネット又はクリーンベンチ内で無菌的に操作する。

3.2 細胞の継代

1) 培養フラスコをインキュベーターから取り出し継代用培養液を取り除く。トリプシン/EDTA 溶液を 2mL 分注し混和する（注 4)。培養フラスコをインキュベーターに５分間入れる。
2) 培養フラスコをインキュベーターから取り出し、継代用培養液を 10mL 加え混和する。シャーレの底面に張り付いている細胞をピペッティングで剥がして 15mL 遠心管に移す（注 4)。
3) 遠心管を遠心分離機に入れ、４℃、100×g で５分間遠心分離操作を行う。
4) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に継代用培養液を適量加えてピペッティングし、懸濁液を作製する（注 4)。
5) 懸濁液の一部を試験管に移し、等量のトリパンブルー液を加えて混和する。
6) 懸濁液を血球計算盤に適量分注し、顕微鏡で細胞数をカウントして懸濁液の濃度（cells/mL）を計算する。
7) 懸濁液を継代用培養液で希釈して 100,000 cells/mL になるようにする。なお、培養マイクロプレートに播種する場合には、懸濁液をアッセイ用培養液で希釈する（注 4)。
8) 継代用培養液で希釈後の懸濁液 5mL を培養フラスコに入れ、インキュベーター内で３～４日間培養する。
9) 細胞の継代操作は起眠後 25 回までを目安として使用する。
10) 細胞の継代中および培養中に、停電などにより測定結果に影響を与える可能性があると試験責任者が判断した場合には、その細胞を破棄する。

（注 4） 安全キャビネット又はクリーンベンチ内で無菌的に操作する。

3.3 細胞の保存

下記に細胞保存の例を記載する。

1) 3.2 の 1)～6)の方法で細胞懸濁液を調製する。
2) 細胞懸濁液を遠心管に移し（注 5)、遠心分離機に入れ、1000 rpm で５分間遠心分離操作を行う。
3) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に細胞凍結用保存液を加えてピペッティングし、細胞懸濁液の濃度が 2.0×10^{6} cells/mL 程度になるように調製する（注 5)。

4) 凍結保存用バイアルに 1mL ずつ分注（注 5）して、ディープフリーザー（-80℃）に入れて保存する。

（注 5）　安全キャビネット又はクリーンベンチ内で無菌的に操作する

4．測定操作

4.1 細胞のマイクロプレートへの播種

1) 3.2 の 7)で調製した懸濁液を培養マイクロプレートの各ウェルに 90μL ずつ分注する。目安として、およそ培養フラスコ 1 個からプレート 5 枚作成が可能である。

2) 培養マイクロプレートをインキュベーターに入れ、24 時間培養する。

4.2 曝露

1) 測定値が定量範囲内に入るよう必要に応じて、第 4 節 4.3 の 4)で調製した測定用試料に DMSO を加えて希釈系列試料を作製する（表 3-5-1）（注 6）。

2) ブランク溶媒、検量線作成用 2,3,7,8-TeCDD 標準液（STD : 濃度調製例 10、20、30、50、100、200、300、500、1000 pg/mL）、及び 1)で作製した希釈系列試料を試験管内でアッセイ用培養液を用いて 10 倍希釈し、測定用試料液を調製する（注 6）。

3) 24 時間培養した培養マイクロプレートをインキュベーターから取り出し、2)で調製したブランク溶媒、STD、希釈系列試料の測定用試料を培養マイクロプレートの各ウェルに 10μL ずつ、３つのウェルに分注する（図 3-5-10）。同一操作で扱う培養マイクロプレートが複数枚ある場合には、それらを１つのバッチとして扱い、バッチごとに STD 希釈列試料を入れる（注 6）。

4) 培養マイクロプレートをインキュベーターに入れ、24 時間曝露する。

（注 6）　安全キャビネット内で無菌的に操作する

表 3-5-1　試料希釈の例

1 倍試料、 5 倍希釈試料、25 倍希釈試料、125 倍希釈試料、625 倍希釈試料を作製する際の調製例

試料	希釈元	分取量（μL）	DMSO 分注量（μL）
1 倍試料	1 倍試料	ー	0
5 倍希釈試料	1 倍試料	20	80
25 倍希釈試料	5 倍希釈試料	20	80
125 倍希釈試料	25 倍希釈試料	20	80
625 倍希釈試料	125 倍希釈試料	20	80

	Blank	STD 10	STD 20	STD 30	STD 50	STD 100	STD 200	STD 300	STD 500	STD1000	
	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	
	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	
	A (×625)	A (×125)	A (×25)	A (×5)	A (×1)	B (×625)	B (×125)	B (×25)	B (×5)	B (×1)	
	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	
	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	

図 3-5-10　96 ウェルプレート上での試料の配置例（注 7）

（注 7）プレートの外周部分のウェルウェルは、培養中に培養液の蒸発等の影響を受けやすいため、PBS(-) 0.1mL を添加し原則として定量には使用しない。

4.3 ルシフェラーゼ活性の測定

1) 曝露が終わった培養マイクロプレートをインキュベーターから取り出し、各ウェルに細胞溶解液と酵素基質を含むホモジニアス長時間発光タイプのルシフェラーゼアッセイ試薬を一定量添加する。

2) 培養マイクロプレートをマイクロプレートミキサーにセットし、一定時間撹拌する。

3) 培養マイクロプレートをルミノメーターにセットし、1 秒間の RLU を測定する。

５．定量

5.1 検量線の作成

1) STD である 2,3,7,8-TeCDD 濃度（X）及びルミノメーターで測定した RLU（Y）をプロットし、用量反応曲線を作成し、細胞の反応性を確認する。一例を図 3-5-11 に示す。

2) 直線性を示す STD 20～100 pg/mL の範囲の点（20, 30, 50, 100 pg/mL）を用いて一次回帰式による検量線を作成する。定量はこの濃度範囲内で行う。一例を図 3-5-12 に示す。

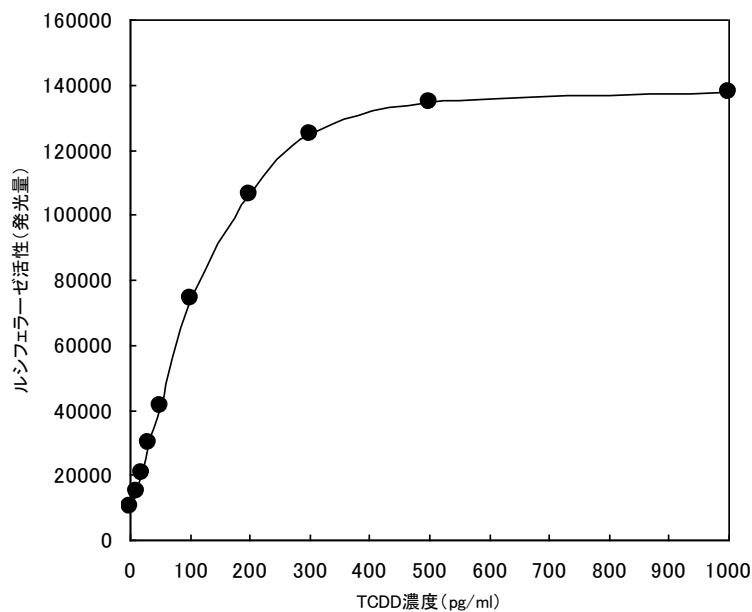



図 3-5-11　2,3,7,8-TeCDD（STD）の用量反応曲線の一例

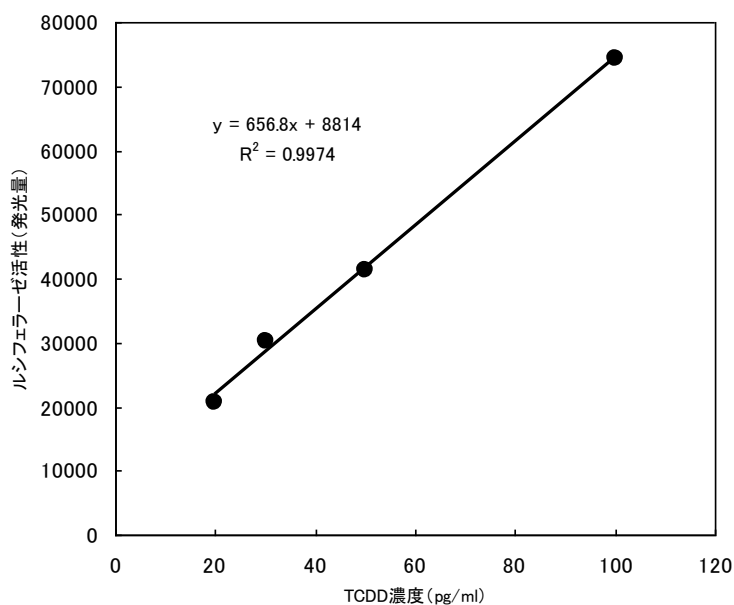



図 3-5-12　2,3,7,8-TeCDD（STD）による検量線の一例

5.2 検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、検量線作成用標準液の測定操作により得られたデータから、測定量（毒性等量）を求め、管理図に記録し保存する。管理図による処置基準は、管理限界（μ±２σ）からの逸脱状況及び図の傾向等に応じて下記の通りとする（μ：工程平均、σ：測定量（毒性等量）の標準偏差）。

データが１点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の

傾向で外れていくような状態又は偏った測定値が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

5.1 により作成した検量線の 50 pg/mL の点の検量線による換算値（pg/mL）を算出し、管理図にプロットする。一例を図 3-5-13 に示す。

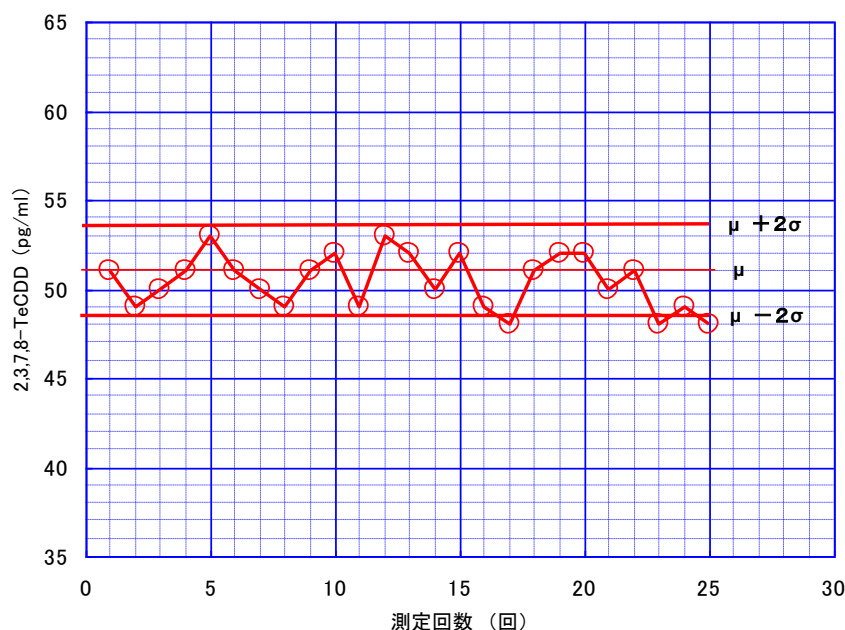



図 3-5-13　管理図の例

5.3 測定試料の定量

1) ルミノメーターで測定した試料の発光量（RLU）を検量線の回帰式に代入し、測定試料の定量を行う。

2) 検量線の定量範囲内にある発光量（RLU）のうち、試料の希釈倍率と定量データの間に良好な直線関係が得られる希釈段階（最低 3 点で判断）について、定量データに希釈倍率を乗じて実測濃度（測定用試料あたり）を求める。

3) 2)で求めた実測濃度（測定用試料あたり）について、抽出に供した実試料及びクリーンアップ、測定に供した試料試料の分取割合等から単位測定試料量あたりの実測濃度を算出する。

4) 試料希釈列の全ての発光量（RLU）が検量線の定量範囲から外れた場合、試料の希釈倍率を再度調製した上で測定を行う。

（備考）排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、　C　：酸素の濃度 On における実測濃度（ng/m^{3}N）
Os　：排出ガス中の酸素の濃度（注４）（%）
Cs　：排出ガス中の実測濃度（ng/m^{3}N）

（注４）排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合には、Os=20 とする。

６．検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲

第２章各論（生物検定法に共通する事項）第３節では、非線形検量線を対象とした「原則として、検出下限等算出用検量線の測定操作により得られた測定値（毒性等量）の定量値の変動係数（CV%）が 30%以下となる点を検出下限、20%以下となる点を定量下限とする」としているが、本方法では、線形検量線を使用するため、本マニュアル第２章第３節に記載の通り、上記算出方法を誘導する際の元となった方法「測定値の標準偏差を検量線の傾きで割った数値を求め、その 3.3 倍に相当する標準物質濃度を検出下限、10 倍に相当する標準物質濃度を定量下限とする」により検出下限及び定量下限を求め、検量線が直線となる最大濃度（通常 100 pg/mL）迄を定量範囲とする。

この標準物質における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に１回十分な性能が得られていることを確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認する。

1) 検出下限等算出用標準溶液の調製例

,3,7,8-TeCDD 標準溶液を DMSO で希釈し、検出下限等算出用標準溶液を調製する。

調製濃度の例：ブランク（DMSO）、10、20、30 pg/mL

2) 検出下限及び定量範囲の算出例

(1) 1)で調製した検出下限等算出用標準溶液を n=5 以上で測定し、濃度とブランク RLU を差し引いた RLU から、直線回帰検量線を作成する。検出下限等算出用検量線の例を図 3-5-14 に示す。

(2) ブランクの各測定値（RLU）の平均値と標準偏差を算出する。

(3) （2）で求めた標準偏差を、(1) で求めた検量線の傾きで割る。

(4) （3）で得られた数値の 3.3 倍に相当する標準物質濃度を検出下限、10 倍に相当する標準物質濃度を定量下限とし、検量線に直線性の認められる範囲（通常約 100pg/mL）までを定量範囲とする。算出例を表 3-5-2 に示す。

表 3-5-2　検出下限及び定量下限の算出例

ブランク（DMSO）の RLU					標準偏差	傾き
11503	11115	11615	11985	12228	432	599
検量線回帰式：RLU=599×2,3,7,8,-TeCDD （R^2=0.966）						
検出下限＝432÷599×3.3 = 2.4 pg/mL						
定量下限＝432÷599×10 = 7.2 pg/mL						

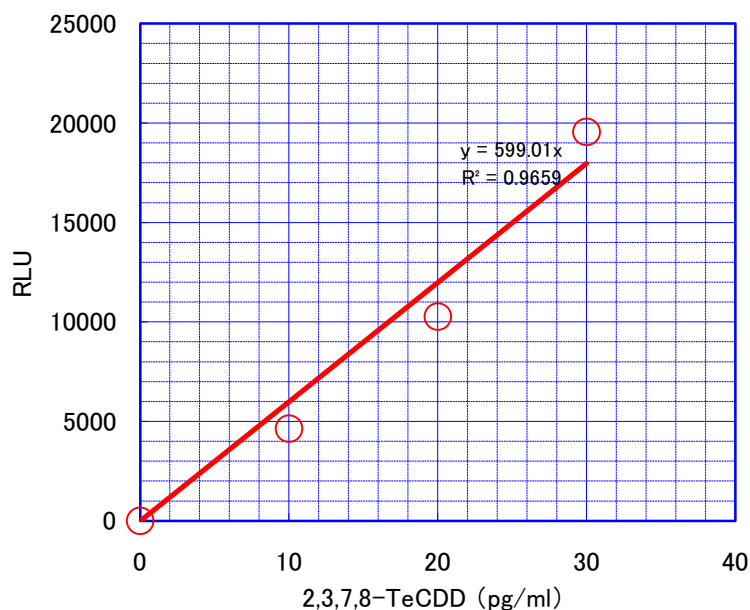



図 3-5-14　検出下限等算出用検量線の一例

3) 実運用上における検出下限及び定量下限

上記の計算を用いた検出下限及び定量下限の値は測定機器の安定性が高い場合にはかなり低い数値として計算される場合がある。しかし現実の運用上は測定機器の分解能等から考え、標準物質の測定値がブランクの測定値に対し 1.5 倍以上の RLU を与える濃度以上で定量することが望ましい。現状の測定系で実際に使用している検出下限及び定量下限を表 3-5-3 に示す。

表 3-5-3　標準物質における検出下限及び定量下限の実運用例

検出下限		定量下限	
0.01 pg/well	10 pg/mL	0.02 pg/well	20 pg/mL

6.2 試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、標準物質における運用上の検出下限及び定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

表 3-5-4　試料における検出下限算出例（排出ガス）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 m^3N	酸素濃度 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/m^3N
排出ガス	0.01	1	4	12	5/10	1	1	0.005

表 3-5-5　試料における検出下限算出例（ばいじん）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/g
排出ガス	0.01	1	5	100	10/10	1	1	0.002

表 3-5-6　試料における検出下限算出例（燃え殻）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/g
排出ガス	0.01	1	5	100	10/10	1	1	0.002

表 3-5-7　試料における定量下限算出例（排出ガス）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 m^3N	酸素濃度 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/m^3N
排出ガス	0.02	1	4	12	5/10	1	1	0.01

表 3-5-8　試料における定量下限算出例（ばいじん）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/g
排出ガス	0.02	1	5	100	10/10	1	1	0.004

表 3-5-9　試料における定量下限算出例（燃え殻）

測定媒体	バイオアッセイ		試料調製					媒体中濃度
	検出下限 pg/well	1 well 中 試料量 μL/well	採取量 g	固形分 %	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度 ng/g
排出ガス	0.02	1	5	100	10/10	1	1	0.004

７．測定量（毒性等量）への換算

5.3 で求めた実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻ともに換算係数を乗じることで測定量（毒性等量）に換算する。なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも６ケ月に１回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定値（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬または施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第６節記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合または相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻については、平成４年厚生省告示第 192 号別表第一（第一号関係）（２）に準拠した方法（ただし、同表ウ（イ）の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定値（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量（毒性等量）を求める際の換算係数の導出について（排出ガス試料）」

多数の排出ガス試料（この例では n=31。n=20 以上が望ましい）について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

（例）排出ガス試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする（図 3-5-15 では Y/X の平均値である 0.2057 を換算係数とした）。

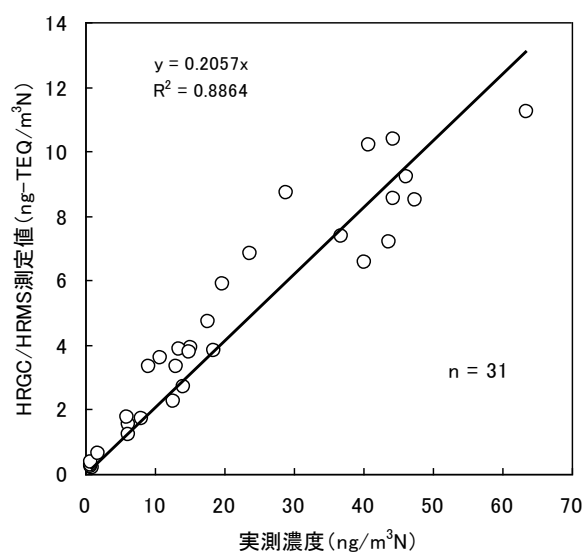



図 3-5-15　換算係数算出例（排出ガス）

「実測濃度から測定量（毒性等量）を求める際の換算係数の導出について（ばいじん試料）」

多数のばいじん試料（この例では n=20。n=20 以上が望ましい）について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

（例）ばいじん試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度を X、HRGC/HRMS 法による毒性等量を Y とし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする（図 3-5-16 では Y/X の平均値である 0.2759 を換算係数とした）。

「実測濃度から測定量（毒性等量）を求める際の換算係数の導出について（燃え殻試料）」

多数の燃え殻試料（この例では n=24。n=20 以上が望ましい）について本測定方法と HRGC/HRMS 法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS 法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

（例）燃え殻試料の換算係数導出の方法

1) 本測定方法による実測濃度をX、HRGC/HRMS 法による毒性等量をYとし、Y/X を求める。

2) 全試料について Y/X の値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする（図 3-5-16 では Y/X の平均値である 0.2069 を換算係数とした）。

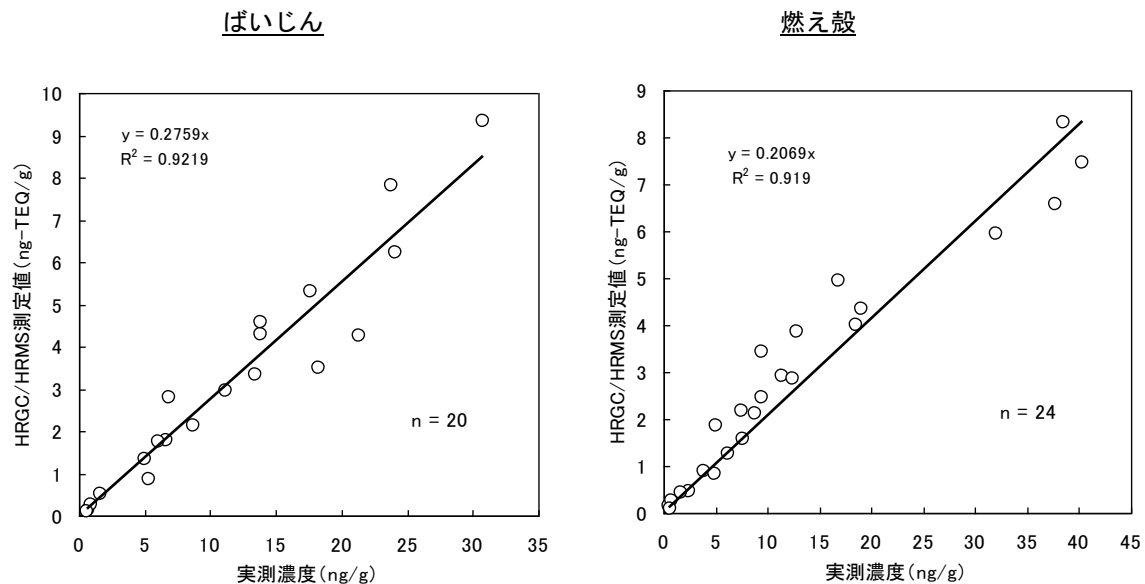



図 3-5-16　換算係数算出例（ばいじん及び燃え殻）

その６　前処理に、硫酸及び多層シリカゲルカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類、アリール炭化水素受容体及びアリール炭化水素受容体核運搬タンパク質の複合体形成反応を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第１の 6)

第１節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗アリール炭化水素受容体（Ah 受容体）複合体ポリクローナル抗体を用いた間接競合酵素免疫測定法による測定を行い、定量化する。測定方法のフローを図 3-6-1 に示す。

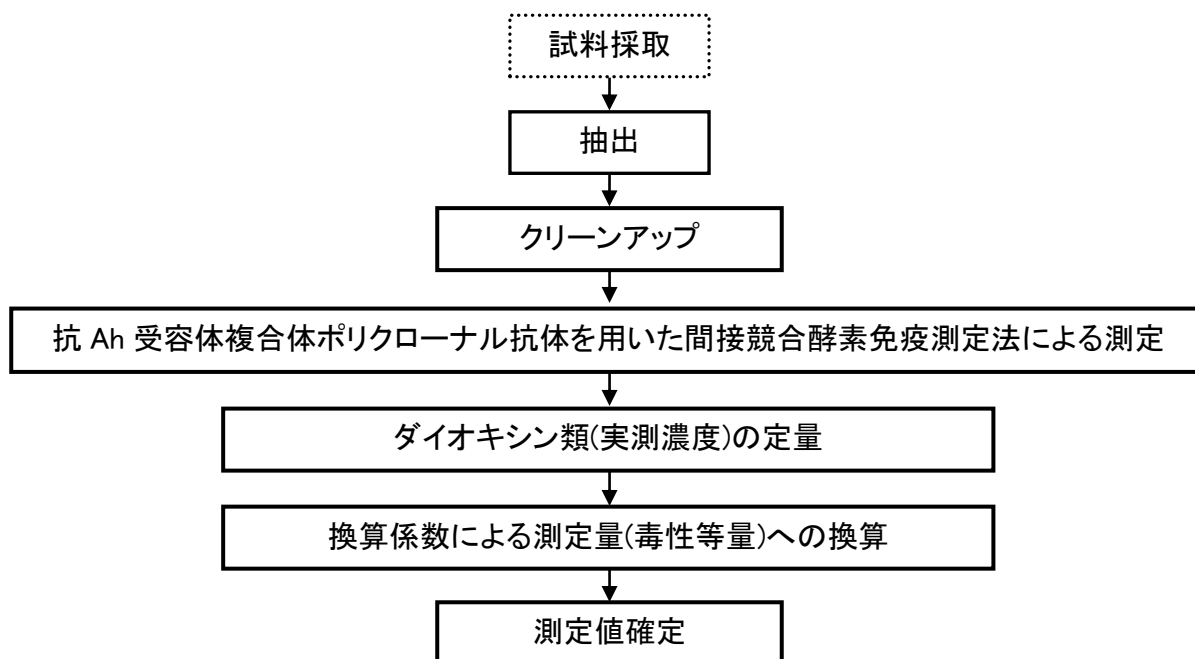



図 3-6-1　測定方法のフロー

第２節 用語の定義

1) **サイトソル**　ここではモルモット（guinea pig）等の肝細胞抽出精製液を指す。
2) **Ah 受容体**　Arylhydrocarbon Receptor。アリール炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、この受容体と結合することにより引き起こされる。
3) **ARNT**　Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator,　Ah 受容体がリガンドと結合する際、複合体を形成する役割を担うタンパク質。
4) **DRE** Dioxin Responsive Element。ダイオキシン応答配列。ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分。
5) **AB1 抗体**　ダイオキシン類との Ah 受容体複合体を認識する抗体。
6) **AB2 抗体**　AB1 を認識する抗体。
7) **DEQ**　Dioxion Equivalent Quantity。本測定法で標準物質(2,3,7,8-TeCDD)を用いて定量した実測値。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V=\frac{Q_{DL}\times k}{1000}\times\frac{1}{C_{DL}}\times\frac{V_C}{V'_C}\times\frac{V_E}{V'_E}$$

ここに、

V	：	測定に必要な最小の試料ガスの量(m³N)
Q_{DL}	：	標準物質における検出下限(pgDEQ/ウエル)
k	：	測定量(毒性等量)への換算係数
C_{DL}	：	必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m³N)
V_C	：	作成した最終試料 DMSO 量(μL)
V'_C	：	１ウエルに添加する最終試料 DMSO 量(μL)
V_E	：	抽出液量(mL)
V'_E	：	抽出液分取量(mL)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例） 0.1 ng-TEQ/m³N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は、0.0033ng-TEQ/m³N)

抽出液を 50 mL に定容し、その抽出液から 25 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 40 μL の測定用試料 DMSO 溶液に調製する場合の排出ガスの試料採取量を以下に示す。

なお、標準物質における検出下限は 1 pgDEQ/ウエル、１ウエルに添加する測定用試料 DMSO 量は 2μL、排出ガスの測定量への換算係数は 0.0494 (TEQ/DEQ)を用いた。ここで、通常、1 回の測定で必要とする最小測定用試料 DMSO 量は 2 ウエル分の 4 μL(2 μL/ウエル×2 ウエル)であるが、精度および操作性の観点から、余裕を見てその 10 倍量である 40 μL 程度を作成しておくものとした。

Q_{DL}	：標準物質における検出下限	1 pgDEQ/ウエル
C_{DL}	：必要となる試料ガスにおける検出下限	0.0033 ng-TEQ/m³N(= 0.1/30)
k	：測定量(毒性等量)への換算係数	0.0494 (TEQ/DEQ)
V_C	：作成した測定用試料 DMSO 量	40μL
V'_C	：１ウエルに添加する測定用試料ＤＭＳＯ量	2μL
V_E	： 抽出液量	50 mL
V'_E	： 抽出液分取量	25 mL

$$V=\frac{1\times 0.0494}{1000}\times\frac{1}{0.0033}\times\frac{40}{2}\times\frac{50}{25}=0.59\ \mathrm{m^3N}$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W=\frac{Q_{DL}\times k}{1000}\times\frac{1}{C_{DL}}\times\frac{V_C}{V'_C}\times\frac{V_E}{V'_E}$$

ここに、

W ： 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限(pgDEQ/ウエル)

k ： 測定量(毒性等量)への換算係数

C_{DL} ：必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

V_C ： 作成した最終試料 DMSO 量(µL)

V'_C ： 1 ウエルに添加する最終試料 DMSO 量(µL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 1 ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は、0.033ng-TEQ/g)

抽出液を 50 mL に定容し、その抽出液から 25 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 40 µL の測定用試料 DMSO 溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。

なお、標準物質における検出下限は、1 pgDEQ/ウエル、1 ウエルに添加する測定用試料 DMSO 量は、2µL、ばいじん及び燃え殻の測定量への換算係数は、0.0523(TEQ/DEQ)を用いた。ここで、通常、1 回の測定で必要とする最小測定用試料 DMSO 量は 2 ウエル分の 4 µL(2 µL/ウエル×2 ウエル)であるが、精度および操作性の観点から、余裕を見て、その 10 倍量である 40 µL 程度を作成しておくものとした。

Q_{DL}	：標準物質における検出下限	1 pgDEQ/ウエル
C_{DL}	：必要となる試料ガスにおける検出下限	0.033 ng-TEQ/g(=1/30)
k	：測定量(毒性等量)への換算係数	0.0523 (TEQ/DEQ)
V_C	：作成した測定用試料 DMSO 量	40µL
V'_C	：1 ウエルに添加する測定用試料 DMSO 量	2 µL
V_E	： 抽出液量	50 mL
V'_E	： 抽出液分取量	25 mL

$$W=\frac{1\times 0.0523}{1000}\times\frac{1}{0.033}\times\frac{40}{2}\times\frac{50}{25}=0.063\quad g$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-6-2 に試料の抽出から測定用試料作成までの前処理のフローの例を示す。

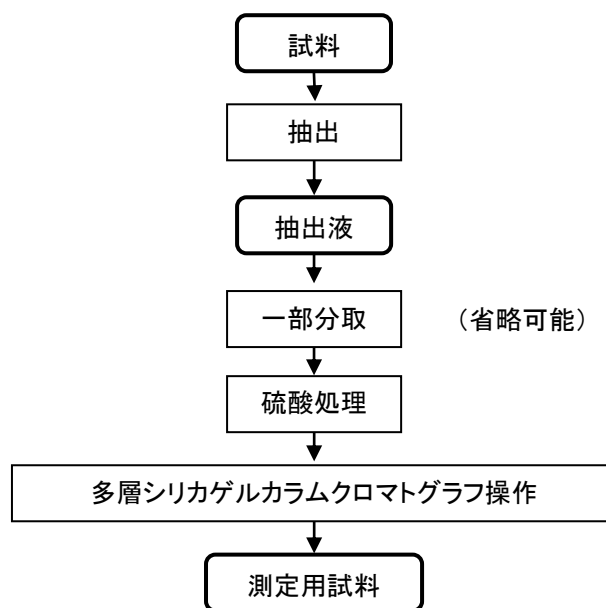



図 3-6-2　試料の抽出から測定用試料作成までのフロー

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　水　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの

2)　メタノール　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの

3)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの

4)　トルエン　JIS K 8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの

5)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの

6)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの

7)　ジメチルスルホキシド(DMSO) JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの

8)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの

9)　硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの

10)　多層シリカゲルカラム

下記のシリカゲルを充填した多層シリカゲルカラム、又は同等の品質のもの

表 3-6-1 多層シリカゲルカラムの構成例(カラム上段から)

種類	グレード	充填量
無水硫酸ナトリウム	残留農薬・ＰＣＢ試験用	3 g
10％ 硝酸銀シリカゲル	ダイオキシン類測定用	1 g
シリカゲル	ＰＣＢ分析用	0.2 g
44％ 硫酸シリカゲル	ダイオキシン類測定用	6 g
シリカゲル	ＰＣＢ分析用	0.2 g

11) ろ紙　抽出に用いる。ガラス製又は石英製で、必要量の風乾した試料が入るサイズのもの。使用に先立ってアセトン洗浄し、さらにトルエン等でソックスレー抽出を行うか、又は 450℃以上で 4 時間以上加熱処理して用いるとよい。

12) 窒素 JIS K1107 に規定する高純度窒素 2 級

3．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1　ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい。

3.2　高速溶媒抽出装置(ASE 抽出装置)

ダイオネクス製 ASE-300 又は同等品。ASE 用の器具一式(セルボディー、セルエンドキャップアセンブリー、溶媒ボトル、捕集ボトルアセンブリー、コンプレッサー等)

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器、ロータリーエバポレータ又は遠心エバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない。

3.4 ターボバップ

窒素気流による濃縮装置

3.5 試験管濃縮装置

窒素気流下により試験管内の有機溶媒を気化させる装置

3.6 その他

吸引ポンプ、最高使用圧力が 0.25MPa の真空ポンプ、又は同等の性能を有するもの

４．前処理操作

4.1　試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2　抽出

1)　排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。

2)　ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 3-6-3 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。以下に、ASE 抽出装置を用いた方法を示す。

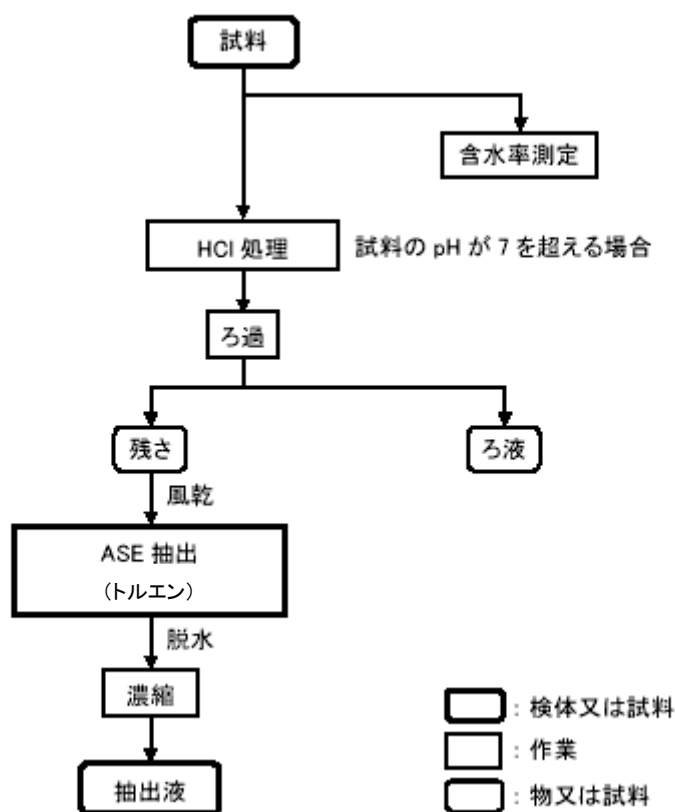



図 3-6-3　燃え殻・ばいじん試料の抽出液調製フローの例

(1) 試料を適量の精製水中に入れて混和し、pH 試験紙で水層の pH を測定する。pH が 7 を超える場合は、塩酸(HCl)処理を行う。pH が 7 以下の場合には塩酸処理を省略し、抽出操作に進む。

(2) 抽出操作を行う場合には損失のないように注意し、容器に残った試料を完全に拭き取りセル中に合わせる。

(3) ASE 抽出装置での抽出は下記の条件で行う。

溶媒	：トルエン 100 %,	サイクル数	： 2 サイクル
加熱	： 7 分,	静置	： 10 分
フラッシング	： 60 %vol,	パージ	： 60 秒
温度	： 150 ℃,	圧力	： 2000 psi

セル　　　　　：　33 mL

(4) 操作手順

a) ASE 抽出用セルの一方にエンドキャップを取り付け、ろ紙を入れ、約 5mm ハイドロマトリックスを敷きつめる。

b) 風乾試料をセルに入れ、空隙をガラスビーズで上部まで満たし、上部もろ紙で塞ぎエンドキャップを取り付ける。

c) セルと捕集用バイアルを ASE 本体にセットし、抽出条件及びスケジュールを確認し、スタートボタンを押し、抽出を行う。

d) トルエン抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、ナスフラスコに合わせる。その際、捕集ボトルも使用溶媒でよくリンスし、抽出液に加える。

e) ナスフラスコをエバポレータ等の濃縮器にセットし、0.5mL 程度まで減圧濃縮する。

（濃縮条件：水浴 60℃、減圧度 50mmHg 程度）。

4.3 クリーンアップ

図 3-6-4 にクリーンアップのフローの例を示す。

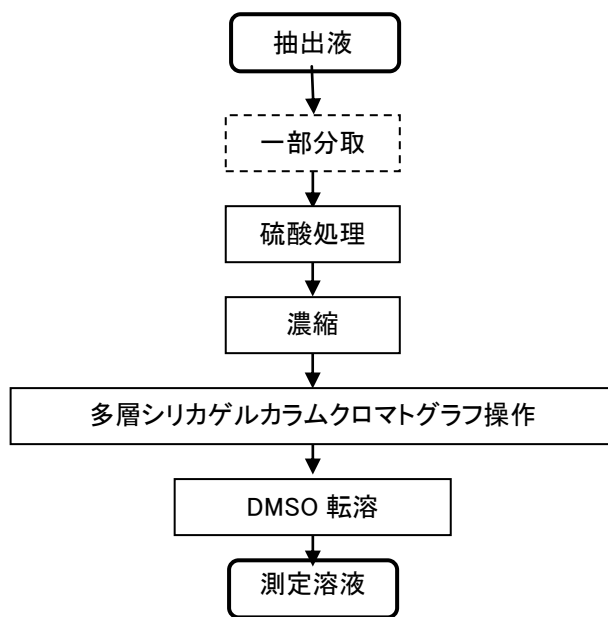



図 3-6-4　クリーンアップのフローの例

1)　硫酸処理

(1) 分液ロートに硫酸約 10mL を入れ、濃縮された試料を移す。

(2) ナス型フラスコ内をヘキサンで洗いながら内容物を完全に分液ロートに移し、最終ヘキサン量を約 40 mL とする。

(3) 分液ロートを振とう機に取り付け、5 分程度振とうし、静置分離後、硫酸層を棄てる。

(4) 硫酸層が呈色しなくなるまで、(3)の操作を繰り返す。

(5) ヘキサン層をヘキサン洗浄水により 3 回洗浄し、ヘキサン層をビーカーに移し、無水硫酸ナトリウムにより脱水する。

2)　濃縮

硫酸処理液をターボバップ専用濃縮容器に移し、40℃加温下で窒素パージにより 0.5mL 程度まで濃縮を行う。

3) 多層シリカゲルカラムの作製

(1) ガラス製クロマト管に石英ウールをつめ、下部を適当量のヘキサンで満たす。

(2) 下から順に、シリカゲル 0.2 g、44%硫酸シリカゲル 6 g、シリカゲル 0.2 g、10%硝酸銀シリカゲル 1 g、無水硫酸ナトリウム 3 g を充填する。このカラムを図 3-6-5 に示す。

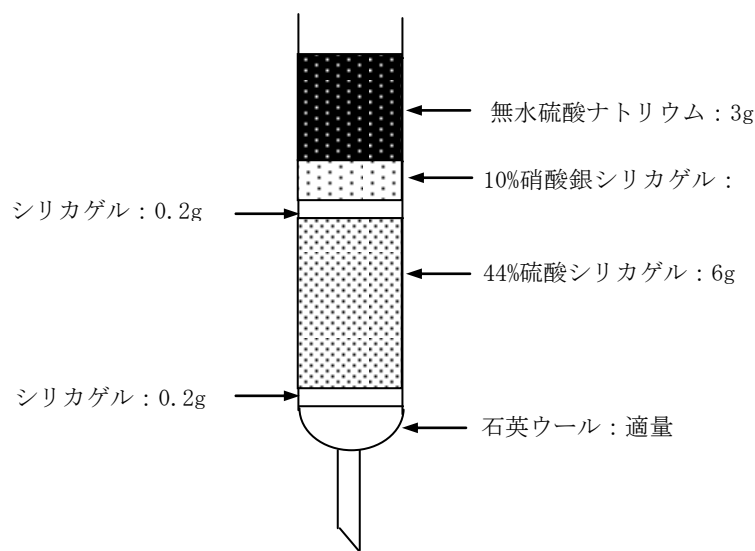



図 3-6-5 多層シリカゲルカラムの例

4) クリーンアップ操作

(1) 多層シリカゲルカラムをヘキサン 70 mL で予備洗浄（流下速度は 1 滴／秒程度）を行う。

(2) 濃縮液を予備洗浄したカラムに添加する。容器をヘキサンで洗いながら、内容物を全て添加する。

(3) ヘキサン 100 mL で溶出（流下速度は 1 滴／秒程度）する。

5) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 多層シリカゲルカラムの流下液を、ロータリーエバポレーターにより 1 mL 程度に濃縮する（濃縮条件：水浴 40 ℃、減圧度 200 mmHg 程度）。

(2) 濃縮液を先細試験管に移し、さらに濃縮容器をヘキサンで洗いながら内容物を全て試験管に移す。

(3) 試験管濃縮装置を 35 ℃に設定し、温度が安定したら試験管を設置する。

(4) 窒素をノズルの先端に手をかざしてかすかに感じるくらいの強さで吹きつけ、試料を濃縮する。

(5) 液量が 0.4 mL 以下になったら、パスツールピペットで試験管の上部からヘキサンを流して内壁を洗い落とす。この時ヘキサンの量は 1 mL の目盛を超えないようにする。

(6) さらに窒素パージを続け、ヘキサンを完全に留去する。

(7) 試験管に DMSO 40 μL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、40～50 ℃程度の温水中で超音波により再溶解し、さらにボルテックスミキサーで攪拌し、これを測定用試料とする。

(8) ここでは、DMSO 40 μL としているが、ピペット操作の容易性・操作誤差・操作ミスを考慮して、最小でも 20μL 以上が望ましい。

(9) 試料をバイアルに移し、試料識別用のラベルを貼り、最終検液として、室温で暗所に保存する。

4.4 自動化クリーンアップ

自動化クリーンアップを 4.3 クリーンアップに代えて利用しても良い。図 3-6-6 に自動化クリーンアップのフロー例を示す。

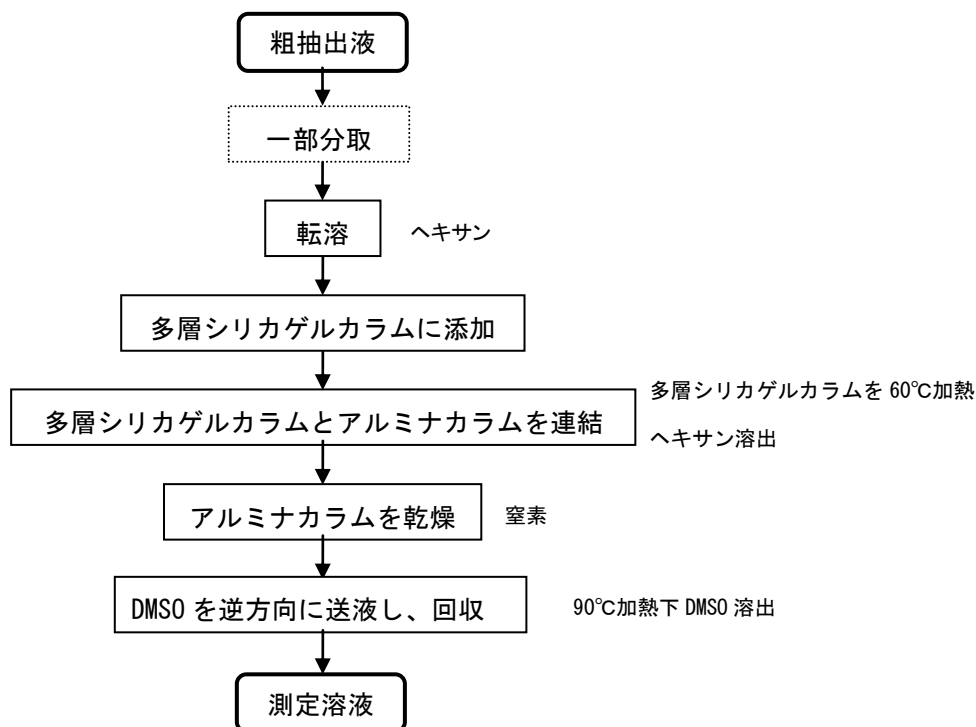



図 3-6-6　自動化クリーンアップのフローの例

1)　抽出液の分取

(1) 抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。

(2) あらかじめ、デカン 0.4 mL を入れた受器に適量の抽出液を入れ、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この濃縮液に適当量のヘキサンを加え、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この操作を 3 回程度繰り返しトルエンを除去する。その後、次に示す多層シリカゲルカラム－アルミナカラム操作によってクリーンアップを行う。

2)　精製カラムの作製

(1)　多層シリカゲルカラム

カラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、シリカゲル 2.3 g、硫酸（44%質量分率）シリカゲル 10.4 g、シリカゲル 0.2 g、硝酸銀（20%質量分率）シリカゲル 3.6 g、シリカゲル 1.5 g を順次充填する。このカラムを図 3-6-7 に示す。

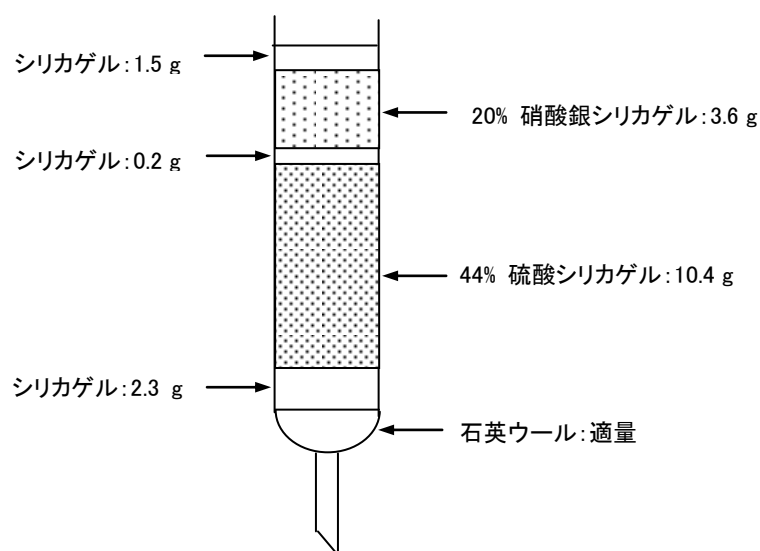



図 3-6-7 自動化クリーンアップの場合の多層シリカゲルカラムの例

(2) アルミナカラム

カラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、アルミナ 1.0 g 程度充填し、その上からガラスウールを詰める。このカラムを図 3-6-8 に示す。

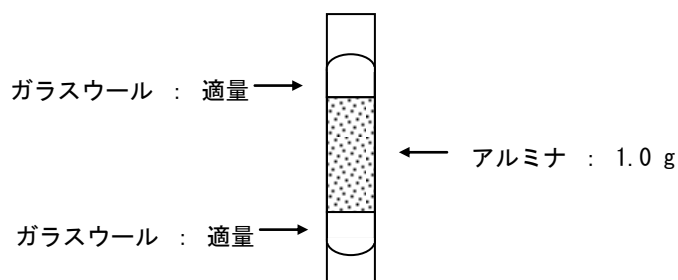



図 3-6-8 自動化クリーンアップの場合のアルミナカラムの例

3) クリーンアップ操作

(1) 図 3-6-9 に示す様に、多層シリカゲルカラムの上端のシリカゲル、硝酸銀シリカゲル及び硫酸シリカゲルの上半分の部分を覆うようにヒーターをセットする。

(2) 濃縮した試料にヘキサンを加え、多層シリカゲルカラムに添加する。添加する試料の液量は容器の洗液を合わせて最大 5 mL までとする。

(3) ヒーターにより 60 ℃で 10 分間カラムを加熱する。

(4) 60 ℃加熱下、ヘキサン 85 mL を送液（2.5 mL/min）する。

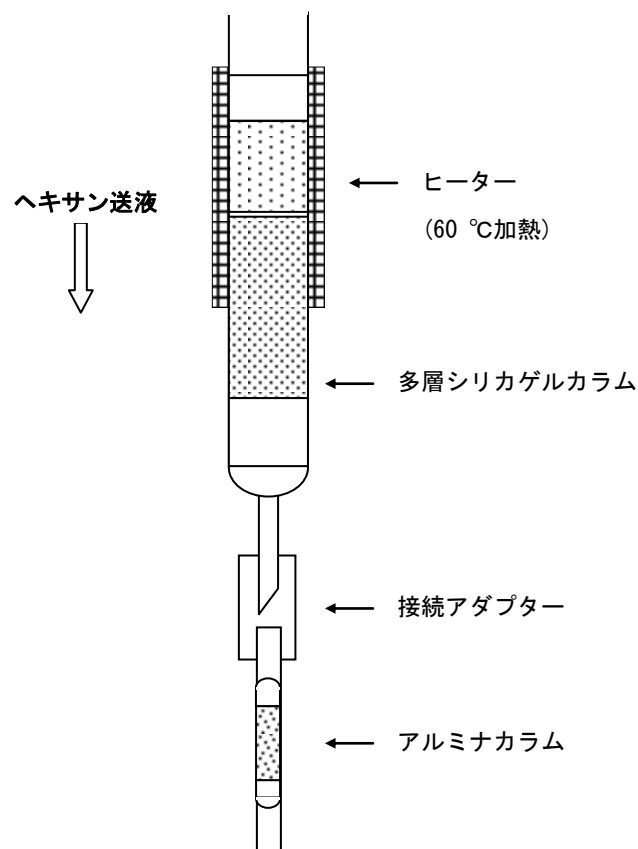



図 3-6-9　多層シリカゲルカラムとアルミナカラムの組み立て例

4)　溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3)の(4)の操作後、アルミナカラムに窒素を通じ、ヘキサンを除去する。

(2) アルミナカラムを包み込むようにヒーターをセットし、90 ℃で 10 分間加熱する。

(3) 90 ℃加熱下、3) の (4) のヘキサンの送液方向とは逆方向に、即ちアルミナカラム下端側から DMSO 2.5 mL を送液 (2.5 mL/min) し、上端側から溶出する DMSO 溶液約 0.9 mL を予め秤量済みのバイアル瓶に回収する。図 3-6-10 にアルミナカラムを反転させない場合の操作例を示した。

(4) 回収後、バイアル瓶を秤量し、密栓後、室温で暗所に保存する。秤量の差分を DMSO 定容量とする。

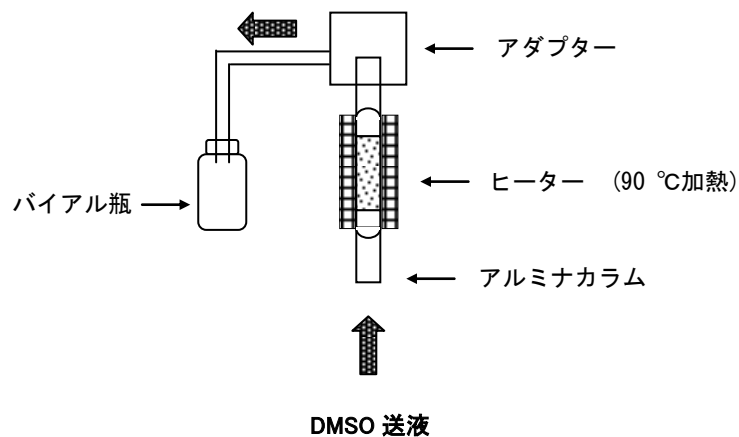



図 3-6-10　アルミナカラムを反転させない場合の DMSO への置換操

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類、Ah 受容体及び ARNT の複合体に対して特異的に反応する抗 Ah 受容体複合体ポリクローナル抗体を用いた間接競合酵素免疫測定法によりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,3,7,8-TeCDD を用いて検量線を作成し、試料の吸光度から算出した実測濃度に排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量(毒性等量)を算出する。

２．使用キット、試薬、器具及び装置

2.1 使用キット

使用キット（アリール炭化水素受容体には、モルモット由来の細胞質液（サイトソル）に含有されるものを、アリール炭化水素受容体核運搬タンパク質（ＡＲＮＴ）には、バキュロウィルスの発現系を用いて生産したヒト由来のものを、ダイオキシン類応答配列ＤＲＥには、化学合成したものを、抗アリール炭化水素受容体複合体ポリクローナル抗体には、ヤギ由来の融合細胞（ハイブリドーマ）から収得したＡＲＮＴを特異的に認識する抗体を使用する。）は、以下の試薬等から構成されるものである(注 1)。

1)	**サイトソル(Cytosol)***F	7.5 mL×4 本
2)	**ARNT 抽出液（ARNT Extract）***F	250μL×2 本
3)	**DRE***F	60μL×2 本
4)	**アクチベータ(Activator)** *F	0.75 mL×2 本
5)	**AB1 抗体***C	120 μL
6)	**AB 希釈液***C	25 mL×2 本
7)	**洗浄液***C（ELISA プレートの洗浄用溶液）	25 mL
8)	**検出溶液***C（検出タブレットの溶解用溶液）	33.3 mL
9)	**検出タブレット***C（発色のための錠剤）	4 個
10)	**ELISA プレート***C	１ 個(蓋つき)
11)	**α ナフトフラボン(αNAP)** *C **標準物質**	200 μL(濃度 0.5 mg/mL DMSO)
12)	**AB2 抗体***C	120 μL
13)	**リザーバー,チューブ**	5 個
14)	**チューブ**	1 本
15)	**取扱い説明書**	1 冊

（注１） 保管種類には冷蔵（＊Ｆ）と冷凍(＊Ｃ)の２種類があるので、受け取り後、それぞれ、冷凍庫（-80℃）と冷蔵庫（+4℃）に保管すること。

2.2 試薬

測定に用いる使用キット以外の試薬は、次による。

1) 標準物質 2,3,7,8-TeCDD(濃度 32 ng/mL DMSO) （注 2）

（注 2）本キット用に販売されている調整済標準試薬を使用するのが望ましい。

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

	器具及び装置	
1)	吸光マイクロプレートリーダー	分光光度計、測定波長 405 nm
2)	冷凍庫	-80 ℃
3)	冷蔵庫	4 ℃
4)	恒温器	30 ℃
5)	プレートオウオッシャー	96 穴マイクロプレート同時洗浄用
6)	ボルテックスミキサー	
7)	マルチピペット	200～400 μL 12 チャンネル用が望ましい。
8)	ピペッター	2～10 μL
9)	ストップウオッチ	
10)	アスピレーター	
11)	メスシリンダー	1000 mL
12)	ビーカー	1000 mL×3 個
13)	廃液用タンク	5 L 有機溶剤系用
14)	廃液用タンク	5 L 水系用
15)	マイクロチップ	2 μL(1 ﾌﾟﾚｰﾄ当り 20 個使用)
16)	チップ	200 μL(1 ﾌﾟﾚｰﾄ当り 15 個使用)
17)	チューブ	1 mL（必要数）
18)	紙タオル	2 箱
19)	手袋	2 箱
20)	キムワイプ	2 箱
21)	アルミホイル	1 箱

3．キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守すること。

1) キットの有効期間は、発送日から 3 ヶ月。キットを分割使用する場合は、未使用の試薬類及びプレートを適切な保存条件で保管すること。 だたし、冷凍保存の指示がある試薬の分割の残りは、解凍せずに、冷凍保管すること。凍解した場合には再使用できないので注意のこと。冷蔵保管の指示がある試薬の分割の残りは、速やかに、冷蔵保存すること。
2) 本キットを構成する試薬の「ARNT extract」は遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に該当するため、その保管・取り扱い・廃棄は関連規則に準拠すること。

4．測定操作

測定操作の手順を図 3-6-11 に示す。

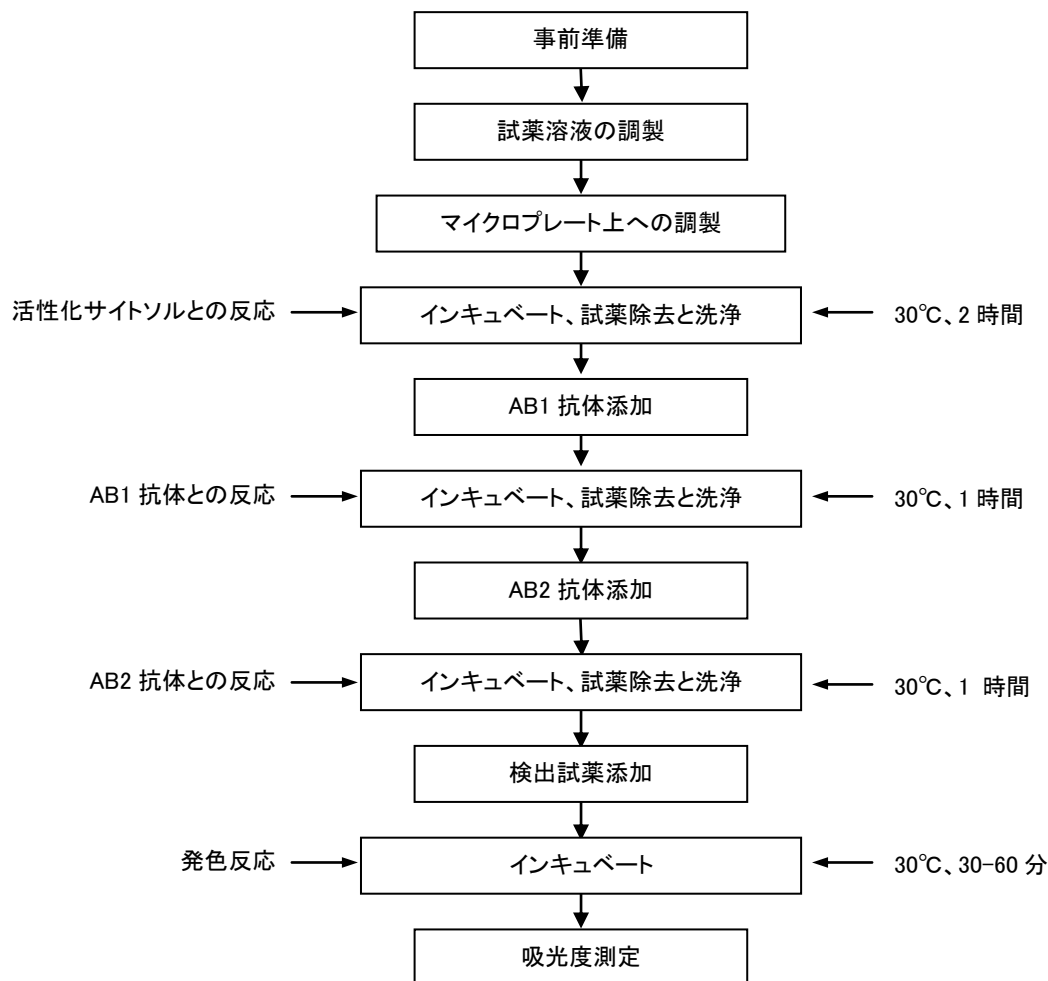



図 3-6-11　本生物検定法による測定のフロー

4.1　事前準備

1) ELISA プレートの配置の決定

(1)　試料

試料は通常 4 段階の 2 倍希釈系列とする。1 列 8 段階の 2 倍希釈でも良い。

(2)　標準液

標準液は 7 段階あるいは 6 段階の 2 倍希釈系列を用い、各 3 重測定を行う。

標準液の濃度はウェル内反応溶液 200µL あたり 64pg, 32pg, 16pg, 8pg, 4pg, 2pg,1 pg, 0 pg の 7 段階あるいは、64pg, 32pg, 16pg, 8pg, 4pg, 2pg, 0pg の 6 段階希釈系列でも良い。

(3)　操作ブランク

定期的に操作ブランクを行うこと。操作ブランクは 3 重測定とする。

(4)　配置

ELISA プレートでの配置例を図 3-6-12,に示す。図 3-6-12 は、①測定対象試料は 18 種類で 4 段階の 2 倍希釈、②標準液は 7 段階 2 倍希釈の 3 重測定、及び③溶媒ブランク（DMSO のみ）の 3 重測定の場合のレイアウトを示している。図 3-6-13 は、①測定対象試料は同じく 18 種類で 4 段階の 2 倍希釈、②標準液は 6 段階 2 倍希釈の 3 重測定、③溶媒ブランク（DMSO のみ）の 3 重測定および④操作ブランクの 3 重測定の場合のレイアウトを示している。図 3-6-12 のレイアウトでは、標準液の最

小濃度が 1 pg/ウエル、図 3-6-13 のレイアウトでは、検量線の最小濃度が 2 pg/ウエルとなる。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	試料1 原液	試料2 原液	試料3 原液	試料4 原液	試料5 原液	試料6 原液	試料7 原液	試料8 原液	試料9 原液	標準液 64pg	標準液 64pg	標準液 64pg
B	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	32pg	32pg	32pg
C	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	16pg	16pg	16pg
D	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8pg	8pg	8pg
E	試料10 原液	試料11 原液	試料12 原液	試料13 原液	試料14 原液	試料15 原液	試料16 原液	試料17 原液	試料18 原液	4pg	4pg	4pg
F	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2pg	2pg	2pg
G	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	1pg	1pg	1pg
H	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	溶媒 ブランク	溶媒 ブランク	溶媒 ブランク

図 3-6-12 ELISA プレートの配置の例-操作ブランクのない場合-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	試料1 原液	試料2 原液	試料3 原液	試料4 原液	試料5 原液	試料6 原液	試料7 原液	試料8 原液	試料9 原液	標準液 64pg	標準液 64pg	標準液 64pg
B	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	32pg	32pg	32pg
C	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	16pg	16pg	16pg
D	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8pg	8pg	8pg
E	試料10 原液	試料11 原液	試料12 原液	試料13 原液	試料14 原液	試料15 原液	試料16 原液	試料17 原液	試料18 原液	4pg	4pg	4pg
F	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2倍希釈	2pg	2pg	2pg
G	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	4倍希釈	溶媒ブランク	溶媒 ブランク	溶媒 ブランク
H	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	8倍希釈	操作 ブランク	操作 ブランク	操作 ブランク

図 3-6-13 ELISA プレートの配置の例-操作ブランクのある場合-

2) インキュベート用温浴槽の準備

恒温器内においても ELISA プレートの保温温度を一定に保持するため、インキュベート内に置ける水浴槽を準備し水温を 30 ℃に保持しておくこと。

4.2 試薬溶液の調製

1) 試薬溶液の調製

(1) 標準溶液の調製

標準物質として 2,3,7,8-TeCDD を DMSO 溶媒を用いて 32 ng/mL-DMSO に調製してもよいが、このキット用に販売されている調製済標準試薬を利用することを推薦する。

1 キットでの消費量は 3 重測定であるので、12 µL である(2 µL/ウエル×2 倍×3 重測定=12 µL)。

(2) 洗浄稀釈液の調製

1000 mL のメスシリンダー内にて、洗浄液を蒸留水 500 mL で希釈し調製しておく。

(3) AB1 抗体溶液の調製

AB1 抗体の入ったバイアルの中身を AB 希釈液のビン 1 本に移し、バイアルを共洗い後静かに混合しておく。この調製は最初のインキュベートの最中に行うのが良い。AB 希釈液は 2 本あり、どちらを使っても構わない。

(4) AB2 抗体溶液の調製

AB2 抗体の入ったバイアルの中身を AB 希釈液のビン 1 本に移し、バイアルを共洗い後静かに混合しておく。この調製は AB1 抗体添加後のインキュベートの最中に行うのが良い。AB 希釈液は 2 本あり、どちらを使っても構わない。

(5) 検出試薬の調製

検出タブレット 4 個を検出溶液の入ったビンに入れる。アルミホイルでビンの周囲を覆い、必ず遮光して、静かに溶解させる。タブレットが完全に溶解するまで最短で 15 分程度かかるので、準備時間を見込んでおくこと。この調製は AB2 抗体添加後のインキュベートの最中に行うのが良い。

2) 活性化サイトソルの調製

(1) 解凍

サイトソル、ARNT 抽出液、DRE、アクチベータを解凍する。サイトソルは冷凍庫から取り出した後、室温の蒸留水を入れたビーカーに入れて解凍すること。

(2) サイトソル-DRE 混合液の調製

解凍したサイトソルを 50 mL チューブ 1 本に移し、DRE のバイアルの中身を加えて混合し、サイトソル-DRE 混合液を作成する。

(3) サイトソル-DRE-ARNT 混合液の調製

ARNT 抽出液をサイトソル-DRE 混合液に加えてサイトソル-DRE-ARNT 混合液を作成する。

(4) 活性化サイトソル溶液の調製

最後に、アクチベータをサイトソル-DRE-ARNT 混合液に加え、静かに混合させる。これを「活性化サイト ソル溶液」と呼ぶ。作成後、必ず氷温に保管する。

(5) 上記の(2)～(4)の調製において、混合操作は泡立てないように静かにかつ迅速に行うこと。

3) 標準液・試料・ブランクの活性サイトソル溶液との調製の例

図 4-1-12 に示す配置の例に従って説明する。

活性化サイトソル溶液 200 µL に対して、①調製した試料（DMSO 溶液）、②標準液（DMSO 溶液）、③溶媒ブランク(DMSO 溶液)がそれぞれ 2 µL の割合になるように、活性サイトソル溶液との調製を行う。ここでは調整方法の例を示す。

(1) 測定試料の調整

1 試料あたりの測定に必要な測定試料量は 2 µL/ウエル×2 ウエル分=4 µL であるので、余裕を見て、5 µL を前処理用チューブ内で活性サイトソル溶液 500 µL と混合・反応させ、調製し準備する。ここでは 18 種類あるので、おのおの調整する。

(2) 標準液の調製

標準液は 3 重測定を行うために必要な標準液量は 2 μL/ウエル×3 重測定×2 ウエル分=12 μL であるので、余裕を見て 15 μL を活性サイトソル溶液 1,500 μL と混合・反応させ、調製し準備する。

(3)　稀釈系列で必要な調整

　測定試料と標準液の調整原液が入るウエル以外での必要な活性サイトソル溶液量は、(98-(18+3))×200 µL=15,000 µL である。余裕を見て 18,000 µL とし、180 µL の DMSO と混合・反応させ、調製し準備する。上記で使用する活性サイトソル溶液の全量は、500µL×18 種類+1,500µL+18,000µL=28,500 µL になる。ちなみに、キットのサイトソル量は 7.5mL×4 ヶ=30,000 µL である。

4.3　ELISA プレート上への調製

1) 最初の試料及び標準液の注入

　上記 4.1 3)で作成した調製済試料（試料 1～9）は A 行 1 列から 9 列まで、及び調製済試料（試料 10～18）は E 行 1 列から 9 列、活性化サイトソル溶液による調製済標準液は A 行 10 列から 12 列にマルチピペットを使って、各々200 µL を注入する。

2) 残りのウェルへの活性化サイトソル注入

　その他のウエルに、調製済ブランク溶液をマルチピペットを使って、各々200 µL 注入する。

3) 希釈系列の調製

　試料については各々4 濃度の希釈系列（稀釈無、2 倍希釈、4 倍希釈、8 倍希釈）、標準液については、6 濃度の 3 反復希釈系列（64 pg、32 pg、8 pg、4 pg、2 pg、1 pg）を下記の手順で作ってゆく。

(1) 試料 1～9 では、B 行の 1 列から 9 列までのウエルにマルチピペットにより、調製済試料 200 µL をおのおの各 200 µL を注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。続いて、各 200µL を吸引し、次の C 行の各ウェルに注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。このピペッティング操作を希釈系列ごとに繰り返し、希釈系列を作成する。系列の最後のウェルから各 200 µL を抜き取り、廃棄物容器などに廃棄する。

(2) 試料 10～18 では、F 行の 1 列から 9 列までのウエルにマルチピペットにより、調製済試料 200µL をおのおの注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。続いて、各 200µL を吸引し、次の G 行の各ウェルに注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。このピペッティング操作を希釈系列ごとに繰り返し、希釈系列を作成する。系列の最後のウェルから各 200µL を抜き取り、廃棄物容器などに廃棄する。

(3) 標準液では、B 行の 10 列から 12 列までのウエルにマルチピペットにより、調製済標準液 200 µL をおのおの注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。続いて、各 200 µL を吸引し、次の C 行の各ウェルに注入し、既に注入してある溶液と繰り返し十分に混合させる。このピペッティング操作を希釈系列ごとに繰り返し、希釈系列を作成する。系列の最後のウェルから各 200 µL を抜き取り、廃棄物容器などに廃棄する。系列の最後の G 行のウェルから各 200µL を抜き取り、廃棄物容器などに廃棄する。

(4) マイクロプレート上への調製が完了した後、カバーをかけ、インキュベートを行う。

(5) ピペッティング操作の際、ウェルから溢れることが無い様に、慎重に行うこと。

4.3　インキュベート、試薬除去と洗浄

1) インキュベート

　インキュベートは下記の各操作段階での条件で行う（表 3-6-2 参照）。ELISA レートにカバーをかけ、温水の入った温浴槽でインキュベートを行う。

表 3-6-2 各操作段階でのインキュベートの条件

操作段階	インキュベート条件
活性化サイトソルとの反応	30℃、2 時間
AB1 抗体との反応	30℃、1 時間
AB2 抗体との反応	30℃、1 時間
発色反応	30℃、30-60 分

2) 試薬除去

インキュベート終了後、試薬を除去する。除去した廃液は、適切な処分を行うため、廃棄物容器に保管すること。活性化サイトソルとの反応液はダイオキシン類を含むので、明示された廃棄物容器に保管すること。処分は規制に準拠し適切に行うこと。

3) 洗浄

(1) リザーバーに洗浄液を入れ、マルチピペットを使ってすべてのウェルに 330μL ずづ分注する。

(2) 2 分間放置後、アスピレーターで除去する。プレートウオッシャーを利用して洗浄してもよい。

(3) 上記(1)、(2)の操作を計 3 回行う。

4.4 発色反応と吸光度測定

1) AB2 抗体反応が終了し、ウェルを洗浄した後、リザーバーに調製した検出試薬を入れ、マルチピペットを使ってすべてのウェルに 200μL 分注する。

2) 吸光度の測定は、30℃のインキュベートで 60 分後、吸光マイクロプレートリーダーにて 405nm の吸光度で行う。30 分後にも測定しておくことが望ましい。

4.5 測定操作時の留意事項

1) 活性サイトソルとの反応、AB1 抗体反応、AB2 抗体反応、発色反応の反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

2) ウェル内の洗浄後、確実に反応物を取り除くため、ELISA プレートをペーパータオルに包み、裏返し、机に叩きつけるように上下に動かすのがよい。

5．定量

5.1 検量線の作成

キットごとに検量線を作成する。下記にその例を示す。

1) 標準溶液濃度と吸光度測定値からブランク吸光度測定値を引いた差とで、最小二乗法により 3 次回帰式による検量線を作成する。標準液は 3 反復で、7 段階あるいは 6 段階の 2 倍希釈系列で行う。

2) 標準液の量は、ウェル 200 μL あたり、7 段階希釈においては、64 pg, 32 pg, 16 pg, 8 pg, 4 pg, 2 pg,1 pg,0 pg(DMSO のみ)、6 段階希釈においては、64 pg, 32 pg, 16 pg, 8 pg, 4 pg, 2 pg, 0pg(DMSO のみ)としてよい。

3) 標準液の各濃度において検量線に CV 値（%）を算出し、20%以下の濃度範囲を定量範囲とする。定量下限は定量範囲の下限値、検出下限は定量下限の 1/3 とする。通常、定量下限は 1～4pg、検出下限は 0.3～1pg になる。図 3-6-14 に検量線の作成の例、表 4-1-3 に回帰式の各濃度における CV(%)の例を示す。

$Y=m_1X^3+m_2X^2+m_3X+b$

Y:pgDEQ　X:mOD

係数 m_1	4.5866E-09
係数 m_2	-1.0961E-05
係数 m_3	2.4150E-02
係数 b	-5.4671E-01
R^2	0.999778069
Yの標準誤差:pg	0.48325395

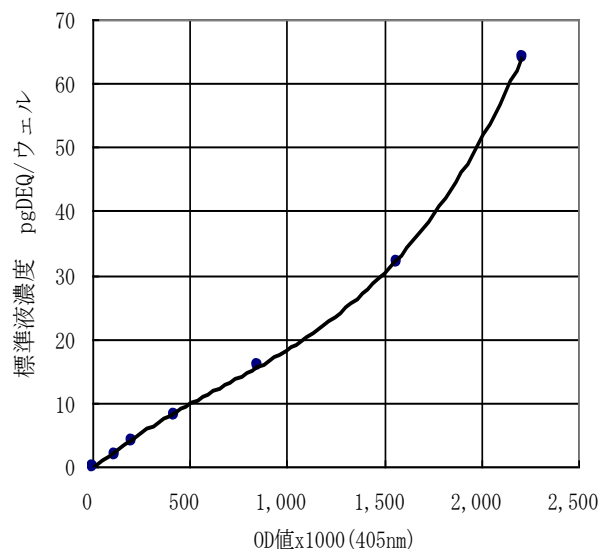



図 3-6-14 検量線の作成の例

式の各濃度での CV(%)値

表 3-6-3　回帰式の各濃度での CV(%)値の例

検量線の評価			定量範囲
注入量 pg	標準誤差 pg	CV %	20%以下
64.0	0.88	1.4	○
32.0	1.17	3.7	○
16.0	0.35	2.2	○
8.0	0.38	4.7	○
4.0	0.21	5.3	○
2.0	0.11	5.5	○
1.0	0.25	24.5	

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

1)　検量線の確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、発色操作でのインキュベート時間が 60 分での吸光度が下記の項目について満足していることを確認し、記録する。この条件を満たさない場合は、キットの劣化による原因が考えられるので、製造メーカーに問い合わせること。

(1)　ブランクでの吸収度：0.5 以下

(2)　64 pg/ウエルと溶媒ブランクでの吸収度の差：1.0 以上

2)　感度変動の管理図

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、検量線作成用標準液の測定操作により得られたデータから、測定量（毒性等量）を求め、管理図に記録し保存する。管理図による処置基準は、管理限界（$\mu\pm2\sigma$）からの逸脱状況及び図の傾向等に応じて下記の通りとする（μ：工程平均、σ：測定量（毒性等量）の標準偏差)。

データが 1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定値が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

5.1 により作成した検量線の 8 pg/μL の点の検量線による換算値（pg/μL）を算出し、管理図にプロットする。一例を図 3-6-15 に示す。

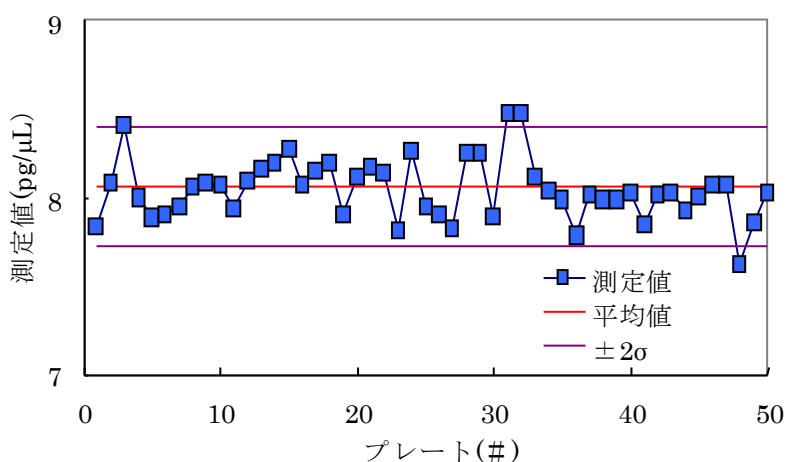



図 3-6-15　感度変動の管理図例

5.3　測定試料の定量

下記の手順で測定試料の定量を行う。

1) ウェル当たりの計測値 Y の算出

各試料の吸光度測定値からブランク吸光度平均値を引いた吸光度測定値の差を X として、検量線の 3 次回帰式に代入し、標準液としてのウェル当たりの計測値 Y を算出する。

Y（pgDEQ/well）$=m_1\times X^3+m_2\times X^2+m_3\times X+b$

ここに、

m_1、m_2、m_3、b　：　最小 2 乗法で求められる係数

X　：　各試料の吸光度測定値-ブランク吸光度平均値

2) 実測濃度の決定

下記の式に従い、サンプルの採取量あたりの実測濃度を決定する。

(1)　排出ガス

$$C_S = Y \times \frac{V_C}{V'_C} \times n \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{1000}$$

ここに、

C_S　：　排出ガス中の実測濃度(ngDEQ/m^3N)

Y　：　1 ウェル当たりの計測値(pgDEQ/well)

V_C　：　作成した試料 DMSO 量(mL)：0.04　mL(40 μL)

V'_C　：　1 ウェルに添加した試料 DMSO 量(mL)：0.002　mL(2 μL)

n　：　希釈倍率(-)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

V　：　試料ガスの採取量(m^3N)

(2)　ばいじん及び燃え殻

$$C_S = Y \times \frac{V_C}{V'_C} \times n \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W} \times \frac{1}{1000}$$

ここに、

C_S　：　ばいじん及び燃え殻中の実測濃度(ngDEQ/g)

Y　：　1 ウエル当たりの決定計測値(pgDEQ/well)

V_C　：　作成した試料 DMSO(mL)：0.04　mL(40 μL)

V'_C　：　1 ウエルに添加した試料 DMSO 量(mL)：0.002　mL(2 μL)

n　：　希釈倍率(-)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

W　：　ばいじん及び燃え殻の採取量(ｇ)

3) 実測値の決定

4 希釈系列での実測濃度を前後のウェル間で比を計算し、その比が 0.8-1.2 の範囲にある実測濃度の平均値を、実測値とする。その比が 0.8-1.2 の範囲にない場合で、定量下限以上であれば、試料濃度が大きすぎるので、希釈し再度測定を行う。また、定量下限以下になった場合で、定量下限が測定したい基準値より大きい場合には、試料量が少ないと考えられるので、量を増やして、抽出あるいはクリーンアップから再試験を行う。実測値の決定の判断方法の例を下記図 3-6-15 に示す。

１．ウエルあたりの実測濃度（pg/DEQ/g）

	1	2	3
A	*54,690*	67,886	3,650
B	*52,139*	*86,606*	7,520
C	*51,121*	*84,332*	13,701
D	*41,723*	*84,811*	22,344
E	*40,074*	*75,994*	39,335
F	*46,777*	*88,602*	*60,040*
G	*39,953*	*88,309*	*71,267*
H	*44,798*	*104,158*	*82,894*

前後比が 0.8−1.2 に対応する実測濃度（斜字）の平均値を実測値とする。

２．前後の実測濃度の比

	1	2	3
B/A	*0.95*	1.28	2.06
C/B	*0.98*	*0.97*	1.82
D/C	*0.82*	*1.01*	1.63
F/E	*1.17*	*1.17*	1.53
G/F	*0.85*	*1.00*	*1.19*
H/G	*1.12*	*1.18*	*1.16*

ウエルの前後比が 0.8−1.2 になる範囲の値を採用する。

図 3-6-15　実測値の決定の例

６．検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における定量範囲および検出下限の確認

標準物質における検量線の測定操作により得られた測定値変動係数(CV%)が 20%以下となる点を定量下限、その 1/3 を検出下限とする。この標準物質における定量下限の検定は、キットごとに行うこととする。「5．定量 5.1 検量線の作成」を参照のこと。

6.2 試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、標準物質における検出下限並びに定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なってくるため、試料ごとに求める。

７．測定量(毒性等量)への換算

排出ガス、ばいじん及び燃え殻の場合の換算の仕方は、おのおの下記の計算による。なお、測定結果の報告様式については、第 2 章第 2 節「測定結果の報告」を参照すること。

1) 排出ガスの場合

本測定法では、実測値 X から測定値（毒性等量）Y への換算は下記の式で行う。

$Y = kg \times X$

ここで、

Y（ngTEQ/ m^3N） ：測定値（毒性等量）

kg（ngTEQ/ngDEQ） ：換算係数: kg=0.0494

X（ngDEQ/ m^3N） ：実測値

2) ばいじん及び燃え殻の場合

本測定法では、実測値 X から測定値（毒性等量）Y への換算は下記の式で行う。

$Y = ka \times X$

ここで、

Y（ngTEQ/g） ：測定値（毒性等量）

ka（ngTEQ/ngDEQ） ：換算係数: ka=0.0523

X（ngDEQ/ g） ：実測値

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。得られた換算係数が、第 6 節の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

第６節 参考資料

１．本生物検定法における換算係数の考え方

本測定法では、N=20 以上のサンプルに対して生物検定法によって測定された実測濃度（DEQ）とHRGC/HRMS 法によって求めた毒性等量（TEQ）の倍率（Y/X）の平均値を換算係数とする。

２．排出ガス試料の場合の換算係数

図 3-6-16 には、排出ガス試料の場合(n=42)における本生物検定法によって測定された濃度（X）とHRGC/HRMS 法によって求めた毒性等量（Y）に対する相関図の例を示す。相関図において、平均倍率は0.0494 であり、この値が換算係数である。

３．ばいじん及び燃え殻試料の場合の換算係数

図 3-6-17 には、ばいじん及び燃え殻試料の場合(n=41)における本生物検定法によって測定された濃度（X）と HRGC/HRMS 法によって求めた毒性等量（Y）に対する相関図の例を示す。相関図において、平均倍率は 0.0523 であり、この値が換算係数である。

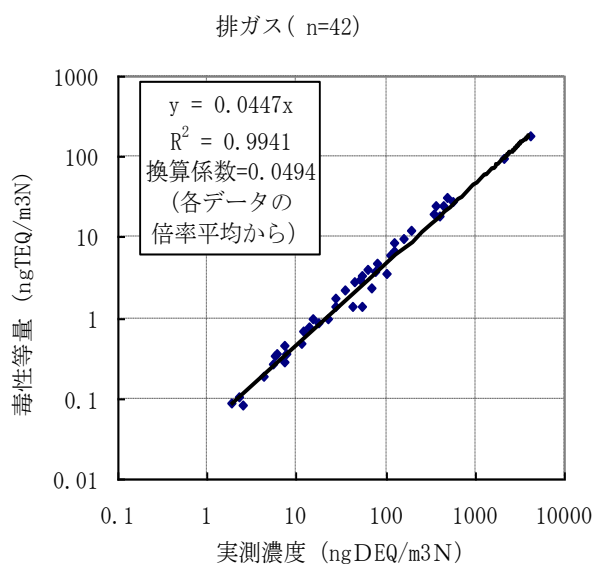



図 3-6-16　排出ガス試料の換算係数算出(例)

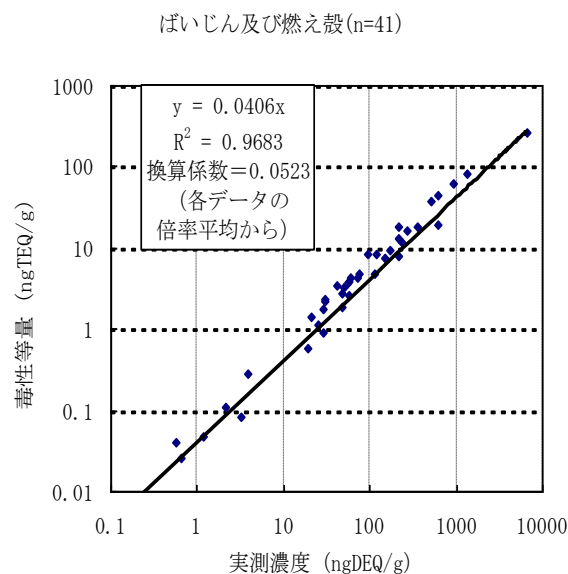



図 3-6-17　ばいじん及び燃え殻試料の換算係数算出(例)

第４章　各論(ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法)

その１　前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 1)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた間接競合酵素免疫測定法による測定により定量する。測定方法のフローを図 4-1-1 に示す。

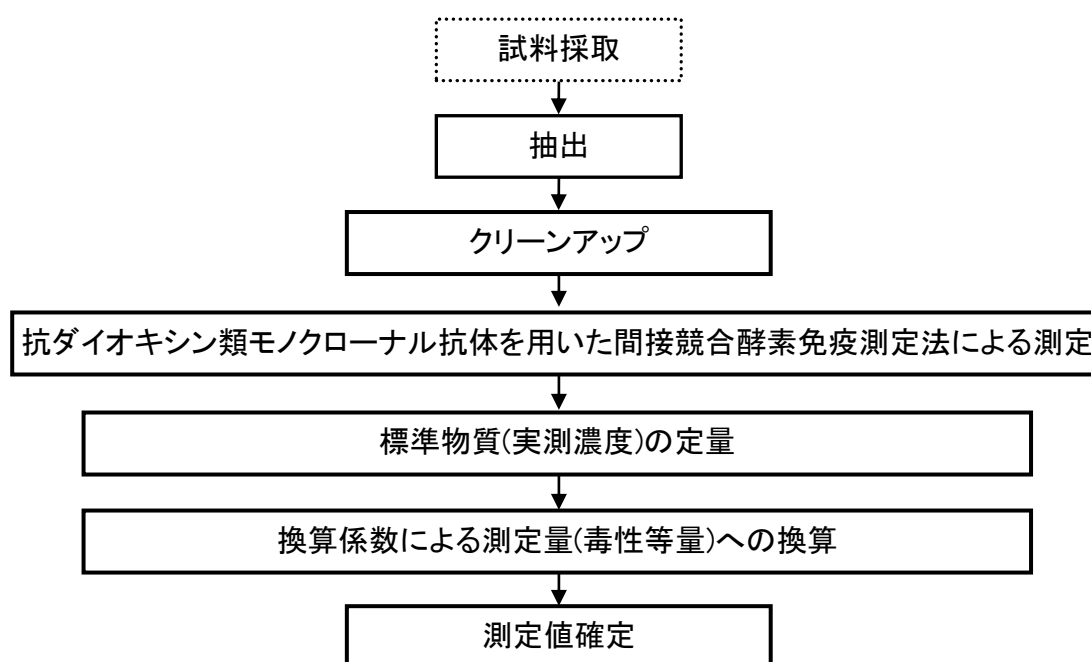



図 4-1-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **抗ダイオキシン類抗体**　免疫反応によって脊椎動物に産生される抗体(タンパク質)を、マウス由来の融合細胞(ハイブリドーマ)を用いて収得したもので、ダイオキシン類と特異的に反応する性質を有する。
2) **一次抗体溶液**　抗ダイオキシン類抗体を緩衝液中に溶解させたもの。
3) **二次抗体溶液**　マウス由来の抗ダイオキシン類抗体と特異的に反応するヤギ由来の酵素標識されたポリクローナル抗体を緩衝液に溶解したもの。
4) **一次免疫反応**　抗ダイオキシン類抗体と抗原(ダイオキシン類)との反応。
5) **二次免疫反応**　固相プレート上の擬似抗原に結合した抗ダイオキシン類抗体と二次抗体との反応。
6) **B/B_0%**　測定対象の吸光度をブランク(濃度 0)の吸光度で除し 100 倍した数値。
7) **IC_{50}**　50%の阻害がかかる濃度(50% Inhibition Concentration）。
8) **精度プロファイル**　精度確認用の標準溶液濃度と変動係数(CV%)との関連図。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = Q_{DL} \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V　：測定に必要な最小の試料ガスの量(m^{3}N)

Q_{DL} ：標準物質の検出下限(ng-TEQ/mL、DMSO 溶液中)

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E ：抽出液量(mL)

V'_E ：抽出液分取量(mL)

C_{DL} ：必要となる試料ガスにおける検出下限（ng-TEQ/m^{3}N)

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5ng-TEQ/m^{3}N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/m^{3}N)

抽出液を 20mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の DMSO 溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 0.011ng-TEQ/mL を用いた。

$$V = 0.011 \times 1 \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.13$$

（原則として、4 時間、3m^{3}N の試料ガス採取を標準とする。）

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下にばいじん及び燃え殻における検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = Q_{DL} \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W　：　測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} ：　標準物質の検出下限(ng-TEQ/mL、DMSO 溶液中)

v　：　測定用試料の液量(mL)

V_E　：　抽出液量(mL)

V_E'　：　抽出液分取量(mL)

C_{DL}：　必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 20mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の DMSO 溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 0.009ng-TEQ/mL を用いた。

$$W = 0.009 \times 1 \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.18$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 4-1-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

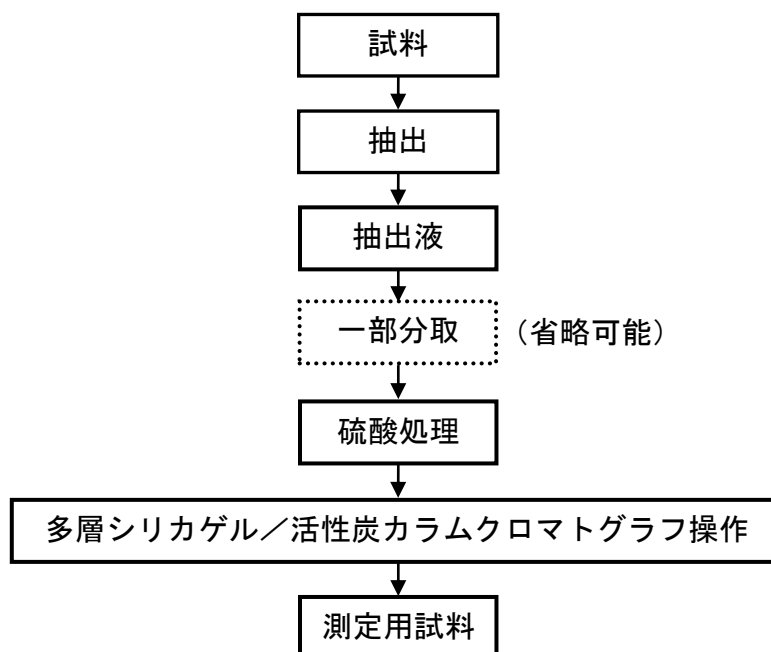



図 4-1-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1) **水** JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの
2) **アセトン** JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3) **トルエン** JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4) **ジクロロメタン** JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5) **ヘキサン** JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6) **ジメチルスルホキシド(DMSO)** JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)
7) **硫酸ナトリウム** JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
8) **硫酸** JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
9) **多層シリカゲルカラム** ダイオキシン類のクリーンアップ用として市販されているものの中で、活性炭カラムと連結して使用が可能なもの。JIS K0311 に規定されたシリカゲル類と同等の分離性能を有するもの。
10) **活性炭カラム** ダイオキシン類のクリーンアップ用として市販されているものの中で、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているもの。逆方向の溶出が可能なもの（リバーシブルカーボンカラム)。
11) **円筒ろ紙** ソックスレー抽出に用いる。ガラス製又は石英製で、必要量の風乾した試料が入るサイズのもの。使用に先立ってアセトン洗浄し、さらにトルエン等でソックスレー抽出を行うか、又は 450℃以上で 4 時間以上加熱して用いるとよい
12) **窒素** JIS K1107 に規定する高純度窒素 2 級

(注 1) ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R 3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 その他

吸引ポンプ、最高使用圧力が 0.25MPa の真空ポンプ、又は同等の性能を有するもの

４．前処理操作

4.1　試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2　抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 4-1-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

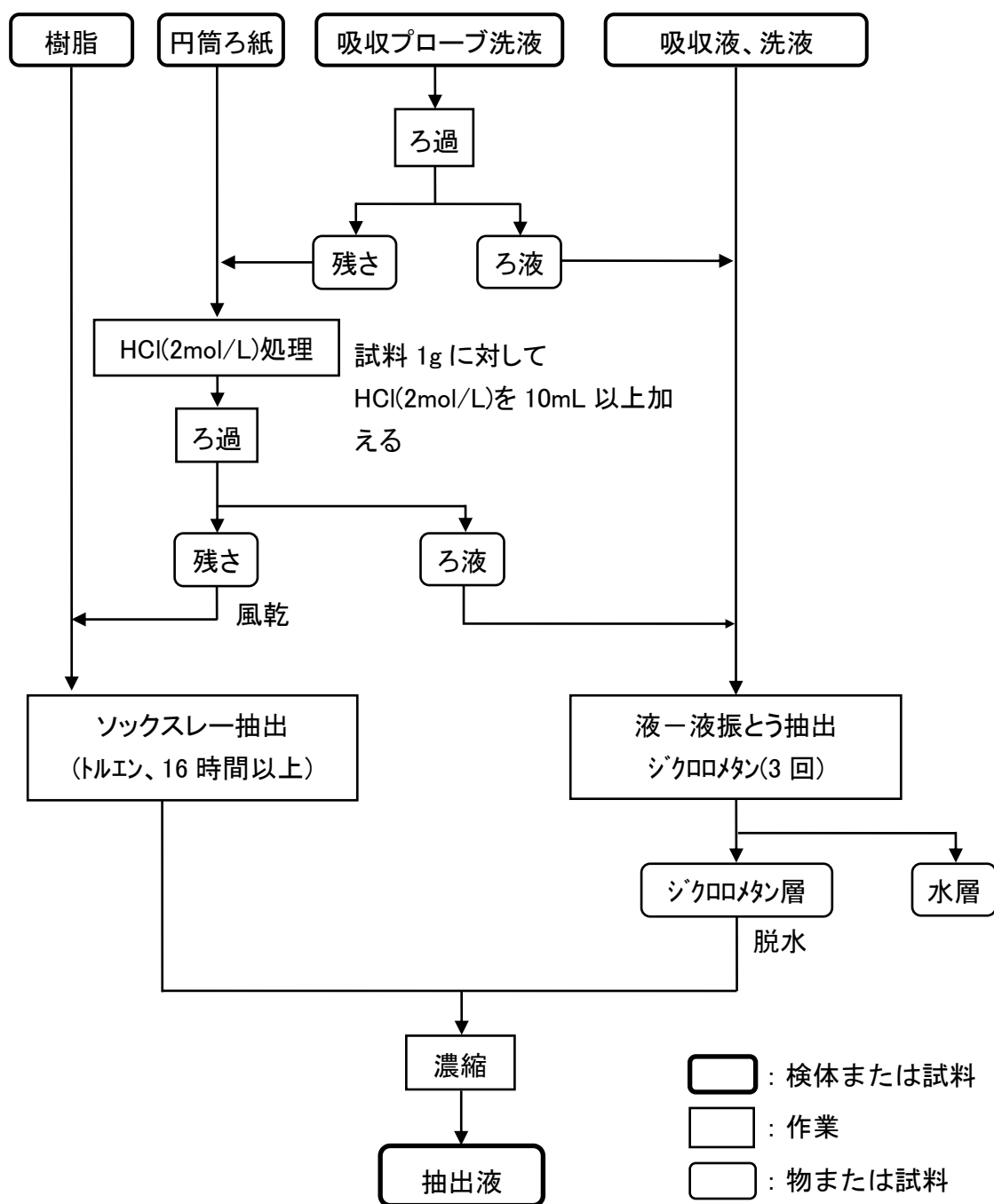



図 4-1-3　排出ガス試料の抽出液調製フローの例

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 4-1-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

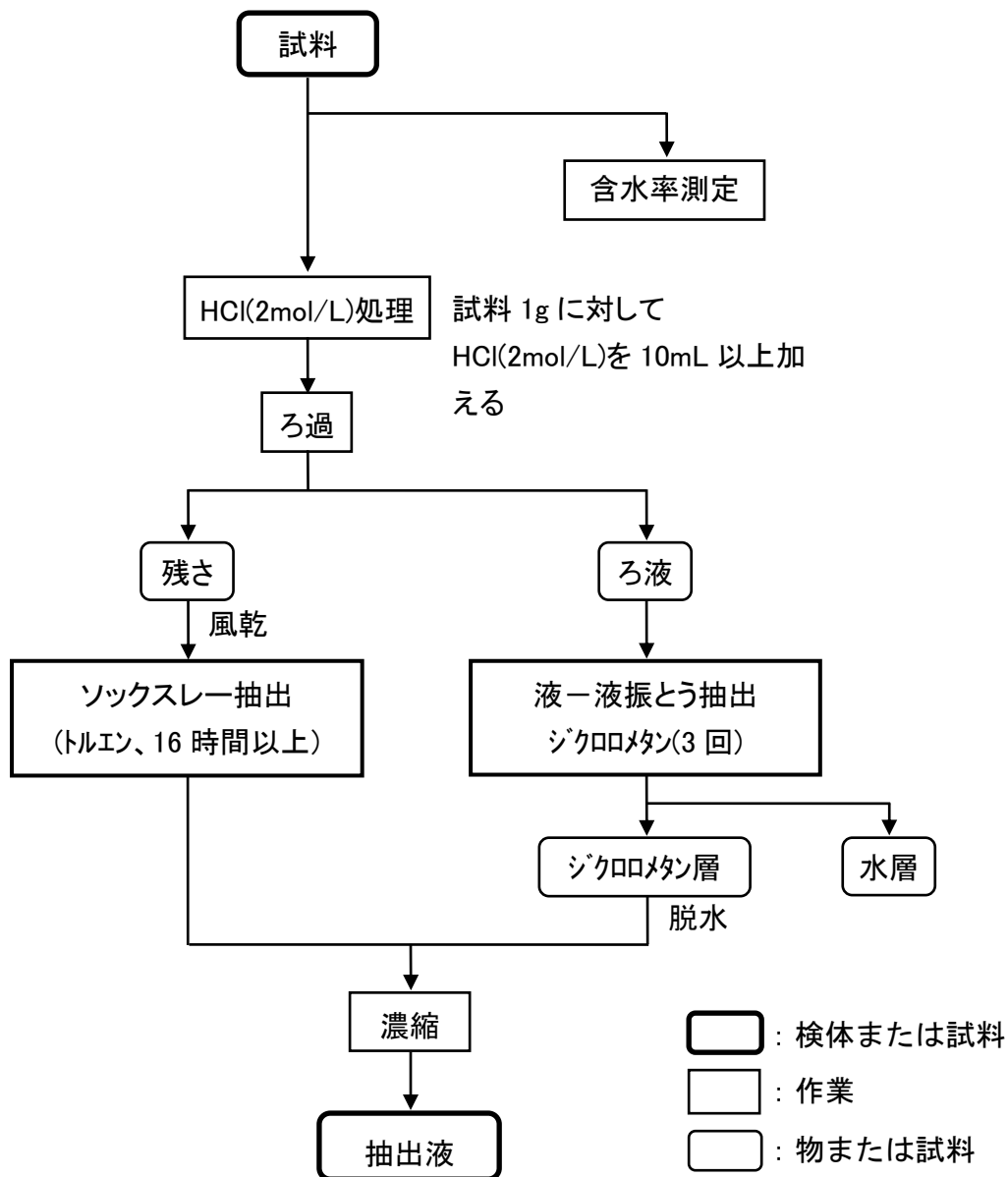



図 4-1-4　燃え殻・ばいじん試料の抽出液調製フローの例

4.3　クリーンアップ

1) 抽出液の分取

抽出液を濃縮し、溶媒を加えて通常 20mL に定容する。採取した試料の量及び試料中の予想されるダイオキシン類濃度から下式を用いて分取量を算出する。最終的に DMSO 溶液中のダイオキシン類濃度が 20～1000pg-TEQ/mL の範囲内となるように分取量を決定する。

$$V'_E = C_1 \times v \times V_E \times \frac{1}{C_2 \times X \times 1000}$$

ここに、V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_1　:　キット測定用試料(DMSO 溶液)中のダイオキシン類濃度
(20～1000pg-TEQ/mL の範囲内が望ましい)

v　:　キット測定用試料(DMSO 溶液)の液量(mL)

V_E　:　抽出液量(mL)

C_2　:　試料中の予想ダイオキシン類濃度(ng-TEQ/g 又は ng-TEQ/m³N)

X　:　試料採取量(g 又は m³ N)

(例)ダイオキシン類濃度が 1ng-TEQ/g と予想されるばいじん試料 5g を抽出し、20mL の抽出液を得て、約 250pg-TEQ/mL のキット測定用試料を 1mL 調製する場合の抽出液分取量は、以下の通りとなる。

$$V'_E = 250 \times 1 \times 20 \times \frac{1}{1 \times 5 \times 1000} = 1$$

2) 精製カラムの作製

市販品を用いる。もしくは JIS K0311 に規定された方法に準拠して、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを作成する。

3) クリーンアップ

図 4-1-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

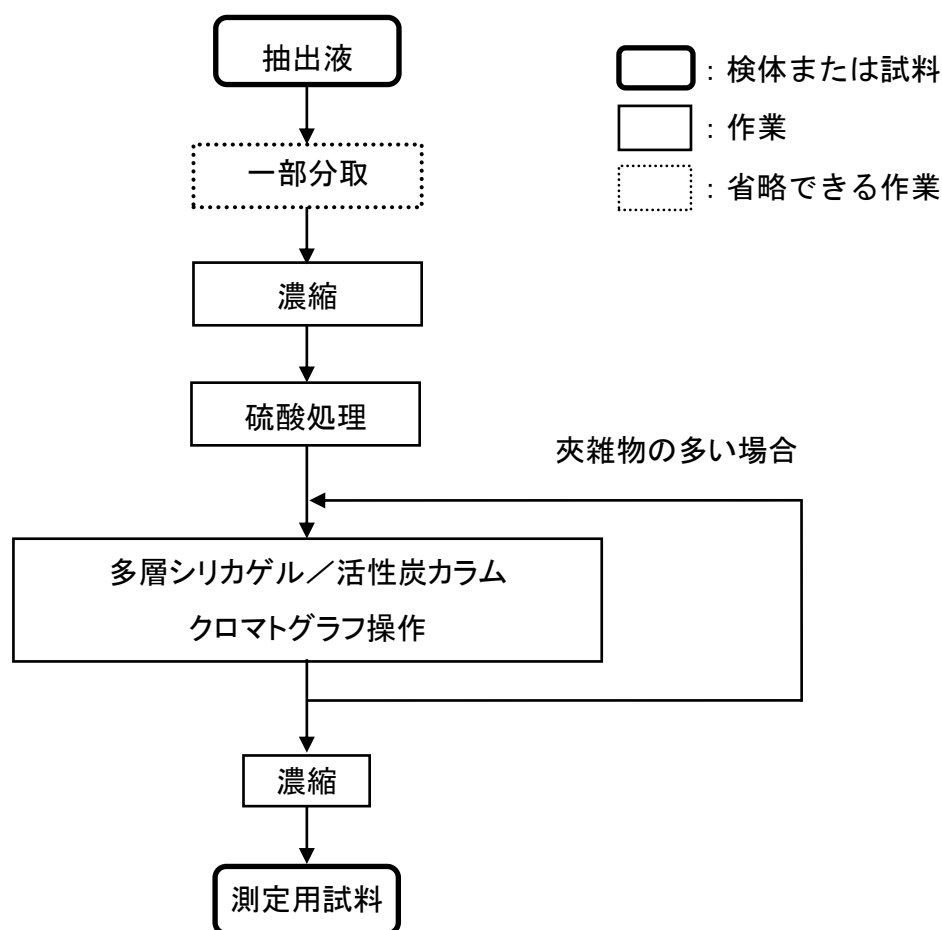



図 4-1-5　クリーンアップのフローの例

(1) 硫酸処理

JIS K 0311「6.4.4 硫酸処理/シリカゲルカラムクロマトグラフ操作又は多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作」に準拠した方法。

(2) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ／活性炭カラムクロマトグラフ操作(注 2)

a) 多層シリカゲルカラムをヘキサン 10mL で洗浄し、ヘキサン流下中に吸引ポンプを使用して空気抜きを行う。

b) 活性炭カラムを逆方向にセットし、最初にトルエン 100mL で洗浄し、トルエン流下中に吸引ポンプを使用して空気抜きを行う。続いてヘキサン 100mL で洗浄する。

c) 多層シリカゲルカラムと活性炭カラムを図 4-1-6 に示す通りに連結する。

d) 溶媒リザーバーをはずし、コックを閉じてヘキサンを多層シリカゲルカラムの上面まで充填する。

e) 多層シリカゲルカラムの上面に試料を充填し、溶媒リザーバーにヘキサン 60mL を入れ、多層シリカゲルに再度セットする。

f) ヘキサンを滴下(2mL/min)する。

g) 多層シリカゲルカラムを取り外し、活性炭カラムを逆向きにして上端に溶媒リザーバーをセットする。

h) 溶媒リザーバーにトルエン 60mL を入れ、コックを開いてトルエンを自然滴下させ、得られた溶出液を 2mL 程度まで濃縮する。

(注 2) 活性炭カラムのプレ洗浄の際に、トルエンがカラム内に残存していると試料中のダイオキシン類が流出し、回収率が著しく低下するため、ヘキサンで十分置換すること。

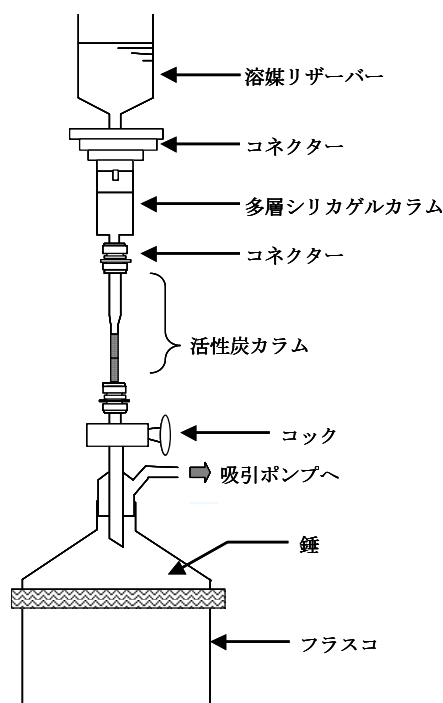



図 4-1-6　多層シリカゲルカラムと活性炭カラムの組み立て例

なお、ここで挙げた精製操作以外の操作であっても、次の条件を満たすことが確認されれば、用いてもよい。この確認には、適用する試料媒体について、5 以上の採取地点の異なる試料を用いて

5 回以上の繰返し、計 25 点以上のデータが必要である。

a) ダイオキシン類の回収率が HRGC/HRMS 法による測定で 90%以上である。

b) 適用しようとする新規の操作方法によって得られた試料液について本測定方法によりえられた結果が、従来の操作方法により得られた試料液で本測定方法により得られた結果の±30%である。

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3)の操作により得られた濃縮液を窒素気流下で試験管壁をヘキサンで洗い込みながら乾固寸前まで濃縮する。

(2) 濃縮後、試験管にすばやく DMSO 溶液 0.5mL を加え、攪拌する。

(3) ⑵の DMSO 溶液を窒素気流下で 10 分間程度静置する。ヘキサン等の疎水性有機溶媒が残っていると、測定操作の段階で検体溶液が白濁することがあるので注意すること。

(4) DMSO 溶液をパスツールピペットでメスフラスコに移す。

(5) 少量の DMSO 溶液で試験管内を洗浄し、その洗液も先のメスフラスコに移す。最終的に DMSO 溶液で一定量に定容する。(通常 1mL に定容する。試料中の予想ダイオキシン類濃度により定容量を変更しても良い。)

(6) 定容した DMSO 溶液を所定の褐色バイアル瓶に移し、密栓後、室温で暗所に保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類の毒性等量との相関性が高い、五塩化ジベンゾフラン類と特異的に反応する抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法によりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,4,5-トリクロロフェノールグリシルグリシン(TCP)を用いて検量線を作成し、試料の吸光度から算出した実測濃度に排出ガス､ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより測定量(毒性等量)を算出する。

２．使用キット、試薬、器具及び装置

2.1 使用キット

使用キット（抗ダイオキシン類モノクローナル抗体には、マウス由来の融合細胞（ハイブリドーマ）から収得した五塩化ジベンゾフラン類を特異的に認識する抗体を、プレート固相抗原には、２，４，５－トリクロロフェノール及び牛血清アルブミン（ＢＳＡ）から合成した化合物を、検量線作成用標準品には、２，４，５－トリクロロフェノール及びグリシルグリシンから合成した化合物を使用する。）は、以下の試薬等から構成されるものである。なお、1)～4)までの試薬は発送時に室温保存用箱に収納されており、5)～12)までの試薬及びパーツは冷蔵保存用箱に収納されている。

1) 2,4,5-トリクロロフェノール-グリシルグリシン(TCP)濃縮標準溶液 1mL

2) 試料希釈用 DMSO 10mL

3) 反応停止液 15mL

4)　**10 倍濃縮洗浄液**　50mL

5)　**抗原固相マイクロプレート**　1 枚

6)　**一次免疫反応用緩衝液**　10mL

7)　**一次抗体溶液**　15mL

8)　**二次抗体濃縮溶液**　0.15mL

9)　**二次抗体希釈用緩衝液**　15mL

10) **発色基質液**　15mL

11) **プレート密閉用シール**　1 枚

12) **取り扱い説明書**

2.2　試薬

測定に用いる使用キット以外の試薬は、次による。

1)　**水**　JIS K 0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等の品質のもの

2.3　器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1)　**吸光マイクロプレートリーダー**　分光光度計、測定波長 450 nm、温度制御機能は不要

2)　**プレートウォッシャー**

3)　**試験管ミキサー**

4)　**冷蔵庫**

5)　**マイクロピペット**　10～100μL

6)　**マイクロピペット**　100～1000μL

7)　**マイクロピペット**　1～10mL

8)　**マルチチャンネルピペット**　8 チャンネル　30～300μL

9)　**マルチチャンネルピペット**　12 チャンネル　30～300μL (8 チャンネルで代用可)

10) **分注用電子ピペット**　マイクロピペットで代用可

11) **ピペットチップ**

12) **ピペッティングリザーバー**

13) **マイクロチューブ**　1.5mL

14) **マイクロチューブ用ラック**　マルチチャンネルピペットに対応したもの

15) **キャップ付マイクロチューブ**　1.5mL 程度の容量

16) **遠沈管**　15mL 容量より大きいもの

17) **ストップウォッチ**

18) **金属トレー**　氷でも代用可、一次免疫反応時のプレート分注操作で使用

19) **ペーパータオル**

3．キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守すること。

1) 冷蔵保存用箱に収納されている試薬及びプレートは、冷蔵庫(2～8℃)にて保管すること。

2) 室温保存用箱にて送付する TCP 濃縮標準溶液は必ず常温(15～25℃)で保管すること。

3) キットの有効期間は、未開封の状態で製造より 1 年間である。キットを分割使用する場合は、未使用の試薬類及びプレートを適切な保存条件で保管し、開封後 1 ヶ月以内に使い切ること。なお、プレートの残りは専用の収納袋に戻し、袋内の空気を極力抜いた状態でしっかりとチャックを閉じておくこと（ここでの「開封」とは、各試薬容器の開栓や、マイクロプレートの真空パック開封を指す)。

4) キットの内容物である「試料希釈用 DMSO」が凍っている場合があるが、品質に影響しない。ただし、使用前に常温で解凍すること。

5) キットを保管する場合は、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度の情報を記録し、保存すること。

4．測定操作

4.1　抗体溶液の調製

1) 一次抗体溶液の調製

調製不要。

2) 二次抗体溶液の調製

二次抗体濃縮液を二次抗体希釈用緩衝液で 150 倍に希釈して使用する。二次抗体溶液は、二次抗体の安定性確保の観点から、二次免疫反応を行うまでの 2 時間以内に調製し、使用するまで冷蔵保管する。

分割使用の場合は、二次抗体濃縮液を必要に応じて量り取り調製すること（ただし開封後 1 ヶ月以内に使い切ること)。

4.2　標準溶液の調製

以下の操作はキャップ付マイクロチューブを用いて行う。

試料希釈用 DMSO を用いて「TCP 標準溶液(1mg/mL)」を 5 倍に希釈し、200µg/mL 標準溶液を調製する(例:TCP 標準液 0.2mL に希釈用 DMSO を 0.8mL 加え混和する)。その後、希釈調製した TCP 溶液(200µg/mL)を試料希釈用 DMSO で 4 倍ずつ希釈し、50、12.5、3.13、0.78、0.20、0.05□g/mL 濃度になるようにそれぞれ調製する(例：TCP 標準溶液 0.2mL に希釈用 DMSO 0.6mL を加え混和する)。最終的に、200µg/mL から 7 段の希釈系列を調製する。

マイクロチューブを 8 本用意し、希釈調製した各 TCP 標準溶液を、濃度系列に従って 80µL ずつマイクロチューブに移す。TCP 濃度が 0.05µg/mL の次のマイクロチューブには試料希釈用 DMSO 80µL を入れる。

4.3　試料希釈系列の調製

DMSO に転溶した試料から、希釈用 DMSO を用いて 4～8 水準の 2 倍希釈系列を調製する。

(例：8 水準の希釈系列で n=2 で測定する場合)

1) マイクロチューブ 8 本を用意し、1 本目のチューブに原液 80µL を加え、残り 7 本の各チューブに希釈用 DMSO 80µL を加える。

2) 更に 2 本目のチューブに原液 80µL を加え、攪拌後にその混合液 80µL を分取して 3 本目のチューブに加えて攪拌する。同様の操作を 8 本目のチューブまで行う。

3) 8 本目のチューブ(残量 160µL)から 80µL を抜き取り、廃棄する。

4.4　混合溶液の調製

マイクロチューブに調製した(a)TCP 標準溶液及び試料に、(b)一次免疫反応用緩衝液及び(c)一次抗体溶液を 1：1：2 の割合で添加する(表 4-1-1)。試薬を添加する順番は(a)→(b)→(c)とする。試薬を添加後、すばやく

マイクロチューブを試験管ミキサー等で攪拌混合する。混合後、4℃で 10 分間静置する。

表 4-1-1　混合溶液の調製

試薬		添加量	添加順
(a)	標準溶液及び試料	80μL	↓
(b)	一次免疫反応用緩衝液	80μL	
(c)	一次抗体溶液	160μL	

4.5　一次免疫反応

4℃で 10 分間静置後、抗原固相マイクロプレートに混合溶液を 100μL/well ずつ分注する。分注操作は冷却した金属プレート上(又は氷上)で行うこと。分注後、軽く抗原固相マイクロプレートを振とうし、密閉シールで抗原固相マイクロプレートを密閉して 4℃(注 4)で 60 分間静置する。

n＝2 で測定する場合の、各混合溶液のマイクロプレートへの分注(配置)例を図 4-1-7 に示す。

	標準物質		試料１		試料２		試料３		試料４		試料５	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	試料 1-1	試料 1-1	試料 2-1	試料 2-1	試料 3-1	試料 3-1	試料 4-1	試料 4-1	試料 5-1	試料 5-1
B	STD7	STD7	試料 1-2	試料 1-2	試料 2-2	試料 2-2	試料 3-2	試料 3-2	試料 4-2	試料 4-2	試料 5-2	試料 5-2
C	STD6	STD6	試料 1-3	試料 1-3	試料 2-3	試料 2-3	試料 3-3	試料 3-3	試料 4-3	試料 4-3	試料 5-3	試料 5-3
D	STD5	STD5	試料 1-4	試料 1-4	試料 2-4	試料 2-4	試料 3-4	試料 3-4	試料 4-4	試料 4-4	試料 5-4	試料 5-4
E	STD4	STD4	試料 1-5	試料 1-5	試料 2-5	試料 2-5	試料 3-5	試料 3-5	試料 4-5	試料 4-5	試料 5-5	試料 5-5
F	STD3	STD3	試料 1-6	試料 1-6	試料 2-6	試料 2-6	試料 3-6	試料 3-6	試料 4-6	試料 4-6	試料 5-6	試料 5-6
G	STD2	STD2	試料 1-7	試料 1-7	試料 2-7	試料 2-7	試料 3-7	試料 3-7	試料 4-7	試料 4-7	試料 5-7	試料 5-7
H	STD1	STD1	試料 1-8	試料 1-8	試料 2-8	試料 2-8	試料 3-8	試料 3-8	試料 4-8	試料 4-8	試料 5-8	試料 5-8

図 4-1-7　96 ウェルマイクロプレート上での試料の配置例

一次反応終了後、プレートウォッシャーで反応液を除去し、各ウェルを洗浄液 300μL で 4 回洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上で抗原固相マイクロプレートをタッピング(強く十分に叩く)し、洗浄液を完全に除去する。

(注 4) 反応温度が高くなる(8℃以上)と感度が低下する場合がある。

4.6　二次免疫反応

洗浄した抗原固相マイクロプレートに希釈調製した二次抗体溶液を 100μL/well ずつ分注する。分注後、プレート密閉シールで抗原固相マイクロプレートを密閉し、室温(25℃前後)で 60 分間反応させる。

二次免疫反応終了後、各ウェルを洗浄液 300μL で 6 回洗浄する。洗浄後、タッピング(強く十分に叩く)で洗浄液を完全に除去する。なお、マイクロプレートの洗浄には、プレートウォッシャーを使用すること。

4.7　発色反応

洗浄した抗原固相マイクロプレートに発色基質液を100μL添加し、室温(25℃前後)で30分間反応させる(要遮光)。試料数が多いときは、各試料の発色反応時間が一定になるようにすばやく分注操作を行うことが望ましい。発色反応後、反応停止液を各ウェルに100μL添加し、反応を停止させる。

4.8　吸光度測定

抗原固相マイクロプレート外側の底面に付着した汚れや水分を、柔らかなペーパータオル等できれいに拭き取った後、波長450nmにおける吸光度を吸光マイクロプレートリーダーで測定する(注5)。

(注5) 吸光度測定は反応停止後、速やかに行うこと(5分以内が望ましい)。

4.9　測定操作時の留意事項

1) 一次免疫反応、二次免疫反応、発色反応の反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

2) 一次抗体溶液をマイクロチューブに分注した後は、速やかに混合攪拌すること。

3) マイクロチューブから抗原固相マイクロプレートへの分注操作は素早く行い、室温で長時間(5 分以上)放置することがないように注意すること。

4) 抗原固相マイクロプレートの洗浄後は、次の試薬を分注する前に、残液が極力少なくなるようにタッピング(強く十分に叩く)を行い、残液を除去すること。

5) 発色反応の際に異常発色が認められる場合は、二次抗体による非特異反応が考えられる。抗原固相マイクロプレートの洗浄条件を再検討し、ウェル内の二次抗体が十分除去できる洗浄条件に設定すること。

6) 反応停止液を分注した後は、5分以内に吸光度を測定することが望ましい。

５．定量

5.1　検量線の作成

標準物質(TCP)の濃度に対して吸光度をプロットし、検量線を作成する。

1)　標準物質

2,4,5-トリクロロフェノール-グリシルグリシン　(略称TCP標準物質)

2)　標準溶液の調製

表4-1-2に検量線作成用標準液の調製例を示す。まず、TCP濃縮標準溶液を試料希釈用DMSOで5倍に希釈してSTD1を調製する。次に、STD1から一定量を分取して試料希釈用DMSOで4倍に希釈してSTD2を調製する。同様の操作で順次4倍希釈操作を行えば、表4-1-2に示す濃度のSTD1～STD7を調製することができる。なお、TCP標準物質を含まない試料希釈用DMSOのみをブランクとする。

表4-1-2　検量線作成用標準溶液の調製例

単位	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	ブランク
ng/well	5000	1250	313	78.1	19.5	4.88	1.22	0
ng/mL	200000	50000	12500	3125	781	195	48.8	0

3)　検量線の作成

各濃度に調製した TCP 標準溶液のキット測定を行い、吸光マイクロプレートリーダーにより波長450nmにおける吸光度を測定する。TCP標準溶液の吸光度測定は、必ず試料測定と同一の抗原固相マイ

クロプレートで同時に行うこと。TCP 標準物質設定濃度及び吸光度から、下記に示す 4-パラメーターの式の各係数(A～D)を算出(吸光マイクロプレートリーダーコントロールソフトを用いても良い)する。検量線作成の例を図 4-1-8 に示す。

$$y = \frac{(A-D)}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

ここに、x ： 実測濃度(ng/mL)

y ： 吸光度

A ： 0 濃度の吸光度

B ： 曲線部分の傾き

C ： IC_{50} (50%阻害濃度)(ng/mL)

D ： 最小吸光度各係数

TCP 標準物質濃度 (ng/mL)		吸光度	B/B_0 (%)
ブランク	0	1.987	100
STD7	48.8	1.825	95.3
STD6	195	1.694	87.4
STD5	781	1.212	64.3
STD4	3125	0.613	30.6
STD3	12500	0.164	8.9
STD2	50000	0.045	2.1
STD1	200000	0.017	0.8

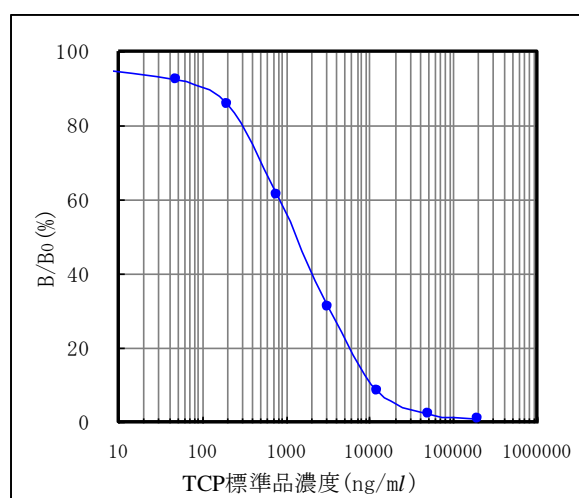



図 4-1-8　検量線作成の例

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

検量線作成用標準溶液の測定操作により得られたデータから測定量(毒性等量)を求め、管理図に記録し保存する。以下に、排出ガスの例を示す。

1) 検量線における IC_{50}(B/B_0 で 50%)付近の吸光度から、4-パラメーターの式を用いて標準物質濃度を算出する。表 4-1-3 の例では、STD5 における測定値の B/B_0 がおよそ 60%(59～63%)に相当する。
2) 標準物質濃度に希釈倍率(例では 256)を乗じた数値を換算式に代入し、測定量(毒性等量)(ng-TEQ/mL)を算出する。(表 4-1-3 参照)
3) 得られた測定量(毒性等量)(ng-TEQ/mL)を平均(例：(5.4+5.4)/2=5.4)し、管理図に記録し保存する。
4) IC_{50} 付近における測定量(毒性等量)の工程平均(μ)と標準偏差(σ)を算出し、±2σ を管理限界とする。変動係数(CV%)は 20%以内に収まることが望ましい。測定媒体ごとの管理限界等の数値例を表 4-1-4 に示す。
5) 1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うと共に、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。

表 4-1-3　管理図用データ導出例(排出ガス)

TCP 標準物質濃度	n=1				n＝2			
	測定値(吸光度)	B/B_0 (%)	標準物質濃度(ng/mL)	TEQ (ng-TEQ/mL)	測定値(吸光度)	B/B_0 (%)	標準物質濃度(ng/mL)	TEQ (ng-TEQ/mL)
ブランク	1.929	100			1.810	100		
STD7	1.787	92.6			1.796	99.2		
STD6	1.587	82.3			1.584	87.5		
STD5	1.138	59.0	→ **196227**	5.4	1.136	62.8	→ **197126**	5.4
STD4	0.507	26.3			0.551	30.4		
STD3	0.147	7.6			0.147	8.1		
STD2	0.032	1.7			0.033	1.8		
STD1	0.018	0.9			0.014	0.8		

表 4-1-4　管理図用データ算出例

測定媒体		排出ガス	ばいじん及び燃え殻
工程平均(ng-TEQ/mL)	μ	5.49	9.72
測定値の標準偏差(ng-TEQ/mL)	σ	0.3219	0.4837
測定値の変動係数(%)	C.V.	5.86	4.98
管理限界(ng-TEQ/mL)	μ± 2 σ	4.85～6.13	8.75～10.7

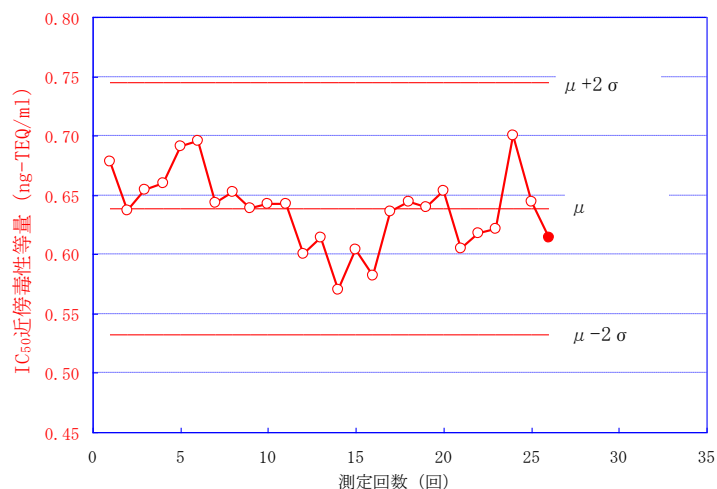



図 4-1-9　管理図の例(排出ガス)

5.3　測定試料の定量

各試料の吸光度を検量線に内挿し、阻害率(B/B_0) 20～80%の範囲でかつ試料の希釈倍率の逆数と吸光度から求めた標準物質換算濃度(実測濃度)との間に良好な直線関係(希釈直線性)が得られる希釈段階について、標準物質換算濃度(実測濃度)に各希釈倍率を掛けた値の平均値（濃度の平均値）を算出する。最後に次式により実測濃度(排出ガスにおいては ng/m³N、ばいじん及び燃え殻においては ng/g)を算出する。

$$C_S = X \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、C_S　：　実測濃度（ng/m³N　又は ng/g）

X　：　濃度の平均値(ng/mL)

V_E　：　抽出液量（mL）

V_E ： 抽出液分取量(mL)

v ： 測定用試料の液量(mL)

V ： 試料採取量（m³N 又は g)

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C ： 酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m³N)

Os ： 排出ガス中の酸素の濃度(注 6)(%)

Cs ： 排出ガス中の実測濃度(ng/m³N)

(注 6) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os=20 とする。

６．検出下限及び定量範囲

6.1 検出下限及び定量範囲の確認

検出下限及び定量範囲の確認は、定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限とし、20%以下となる上下 2 点間を定量範囲とする方法で行う。下記に、排出ガスにおいて n=5 で測定した例を示す。

1) 検出下限等算出用標準溶液の調製例

(1) TCP 濃縮標準溶液を試料希釈用 DMSO で 8 倍に希釈し、STD1 を調製する。

(2) STD1 から一定量を分取し、試料希釈用 DMSO で 4 倍に希釈して STD2 を調製する。

(3) 以下､同様の手順で順次 4 倍希釈液(STD3～STD6)を調製し､検出下限等算出用標準溶液として TCP 標準物質の 6 段希釈系列を調製する。

(4) さらに、TCP 標準物質を含まない試料希釈用 DMSO のみをブランクとする。(表 4-1-5 参照)

表 4-1-5　検出下限等算出用標準溶液

単位	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	ブランク
ng/mL	125000	31250	7813	1953	488	122	0

2) 検出下限及び定量範囲の算出例

(1) 調製した検出下限等算出用標準溶液を４. 測定操作に従って測定する。n=5 の 7 段希釈系列で測定する場合のマイクロプレートへの分注操作の一例を図 4-1-11 に示す。

(2) 吸光度（測定値）を測定して、4-パラメーターの式の各係数(A～D)を算出(吸光マイクロプレートリーダーコントロールソフトを用いても良い)し､吸光度から検出下限等算出用標準溶液相当量(定量値)を算出する。

(3) 検出下限等算出用標準溶液相当量(定量値：ng/mL)を下式に代入し、測定量(毒性等量)に変換する。

$$\text{測定量}(\text{毒性等量})(\mathrm{ng-TEQ/mL}) = 0.0669 \times \left(\frac{\text{定量値}}{1000}\right)^{0.8301}$$

(4) 各希釈濃度域における測定量(毒性等量)の平均値、標準偏差(σ)及び変動係数(CV%)を算出する。(表 4-1-6 参照)

(5) 横軸に測定量(毒性等量)、縦軸に変動係数をプロットした精度プロファイルを作成する。(図 4-1-11 参照)

(6) 作成した精度プロファイルより、定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を読み取り検出下限とする。また、定量値の変動係数（CV%)が 20%以下となる上下 2 点を読み取り定量範囲とする。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ﾌﾞﾗﾝｸ DMSO	ﾌﾞﾗﾝｸ DMSO	ﾌﾞﾗﾝｸ DMSO	ﾌﾞﾗﾝｸ DMSO	ﾌﾞﾗﾝｸ DMSO							
B	STD 6.1	STD 6.2	STD 6.3	STD 6.4	STD 6.5							
C	STD 5.1	STD 5.2	STD 5.3	STD 5.4	STD 5.5							
D	STD 4.1	STD 4.2	STD 4.3	STD 4.4	STD 4.5							
E	STD 3.1	STD 3.2	STD 3.3	STD 3.4	STD 3.5							
F	STD 2.1	STD 2.2	STD 2.3	STD 2.4	STD 2.5							
G	STD 1.1	STD 1.2	STD 1.3	STD 1.4	STD 1.5							
H												

図 4-1-10　96 ウェルマイクロプレート上での検出下限等算出用標準溶液の配置例

表 4-1-6　変動係数の算出例（排出ガス）

Std	標準液濃度 (ng-TEQ/mL)	測定結果(ng-TEQ/mL)						σ	CV (%)
		1	2	3	4	5	平均		
Std.6	**0.012**	0.013	0.0071	0.011	0.014	0.016	0.012	0.0034	**28.3**
Std.5	**0.037**	0.037	0.034	0.035	0.037	0.036	0.036	0.0015	**4.2**
Std.4	**0.12**	0.12	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.0034	**2.8**
Std.3	**0.37**	0.35	0.34	0.37	0.35	0.34	0.35	0.014	**4.0**
Std.2	**1.2**	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1	0.064	**5.7**
Std.1	**3.7**	8.8	15	15	11	6.5	11	3.8	**33.8**

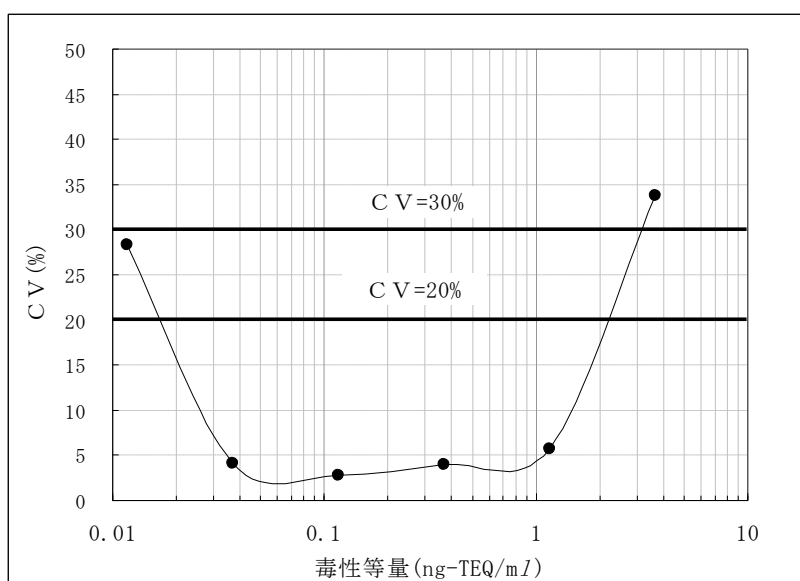



図 4-1-11　精度プロファイルの例(排出ガス)

上記方法により算出した排出ガス、ばいじん並びに燃え殻における検出下限及び定量範囲を表 4-1-7 及び表 4-1-8 に示す。なお、本法により算出した検出下限及び定量範囲は、イムノアッセイに供する DMSO 溶液 1mL 中の毒性等量(ng-TEQ/mL)である。

最終的に 1mL に定容した試料(DMSO 溶液)から 80μL を分取し、これに一次免疫反応用緩衝液 80μL 及び一次抗体溶液 160μL を加えて攪拌混合した溶液 100μL をウェルに分注するため、1 ウェル当たりの試料分注量は 25μL となる。本操作は測定媒体に関わらず同じである。

表 4-1-7　検出下限

測定媒体	検出下限	
	(ng-TEQ/well)	(ng-TEQ/mL)
排出ガス	0.00028	0.011
ばいじん及び燃え殻	0.00023	0.009

表 4-1-8　定量範囲

測定媒体	定量範囲	
	(ng-TEQ/well)	(ng-TEQ/mL)
排出ガス	0.00043～0.055	0.017～2.2
ばいじん及び燃え殻	0.00035～0.075	0.014～3.0

6.2　試料における検出下限及び定量下限の確認

前処理に供した試料量と前処理を経た最終検液量等から、6.1 の操作により得られた検出下限及び定量下限を用いて理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なるため、表 4-1-9 及び表 4-1-10 に例を示す。

表 4-1-9　試料における検出下限

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	検出下限	分注量	ガス量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(m^3N)	(%)	(mL/mL)	(mL)	―	(ng-TEQ/m^3N)
排出ガス	**0.00028**	**25**	4.0	12.0	10/20	1.0	1.0	**0.0055**

測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度
	検出下限	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(g)	(mL/mL)	(mL)	―	(ng-TEQ/g)
ばいじん	**0.00023**	**25**	10.0	10/20	1.0	1.0	**0.0018**

測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度
	検出下限	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(g)	(mL/mL)	(mL)	―	(ng-TEQ/g)
燃え殻	**0.00023**	**25**	50.0	10/20	1.0	1.0	**0.00036**

表 4-1-10　試料における定量範囲 (注.7)

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	定量範囲値	分注量	ガス量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(m^3N)	(%)	(mL/mL)	(mL)	―	($ng-TEQ/m^3N$)
排出ガス	**0.00043～0.055**	**25**	4.0	12.0	10/20	1.0	1.0	**0.0085～1.1**

測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度
	定量範囲値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(g)	(mL/mL)	(mL)	―	(ng-TEQ/g)
ばいじん	**0.00035～0.075**	**25**	10.0	10/20	1.0	1.0	**0.0028～0.60**

測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度
	定量範囲値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍数	実測濃度
	(ng-TEQ/well)	(μL/well)	(g)	(mL/mL)	(mL)	―	(ng-TEQ/g)
燃え殻	**0.00035～0.075**	**25**	50.0	10/20	1.0	1.0	**0.00056～0.12**

(注 7) 本例では、定量下限及び定量上限の両方を求めた。

７．測定量（毒性等量）への換算

測定量（毒性等量）は下記の換算式を用いて実測濃度から算出し、結果を記録する。また、使用した換算式も含め、測定量の算出に至った計算過程を説明できる資料を作成する。

1)　排出ガス

希釈系列 1mL 当たりの実測濃度(ng/mL)×希釈系列希釈倍数(以下「Q」と表記)から換算式を用いて測定量(毒性等量、排出ガス総抽出液当たり)への換算を行う。

$$\text{測定量(毒性等量)}(\mathrm{ng-TEQ/m^3{}_N}) = 0.0669 \times \left(\frac{Q}{1000}\right)^{0.8301} \times \frac{v}{V'_E} \times \frac{V_E}{V}$$

ここに、Q　：　希釈系列希釈倍数に実測濃度を乗じたもの（ng/mL）

V_E　：　抽出液量（mL）

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

v　：　測定用試料の液量(mL)

V　：　試料採取量（m^3N）

2)　ばいじん及び燃え殻

希釈系列 1mL 当たりの実測濃度(ng/mL)×希釈系列希釈倍数(以下「Q」と表記)から換算式を用いて測定量(毒性等量、ばいじん総抽出液当たり)への換算を行う。

$$\text{測定量(毒性等量)}(\mathrm{ng-TEQ/g}) = 0.0601 \times \left(\frac{Q}{1000}\right)^{0.9605} \times \frac{v}{V'_E} \times \frac{V_E}{V}$$

ここに、Q　：希釈系列希釈倍数に実測濃度を乗じたもの（ng/mL）

V_E　：抽出液量（mL）

V'_E　：抽出液分取量(mL)

v　：測定用試料の液量(mL)

V　：試料採取量（g）

なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも６ヶ月に１回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第６節記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K 0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K 0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成4年厚生省告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法4.1～4.3及び5.3に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

濃度既知の試料（この例では n=29、n=20 以上が望ましい）を本測定方法により測定し得られた実測濃度(ng/mL)と、HRGC/HRMS 法により測定し得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/mL)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した（図 4-1-12 参照)。

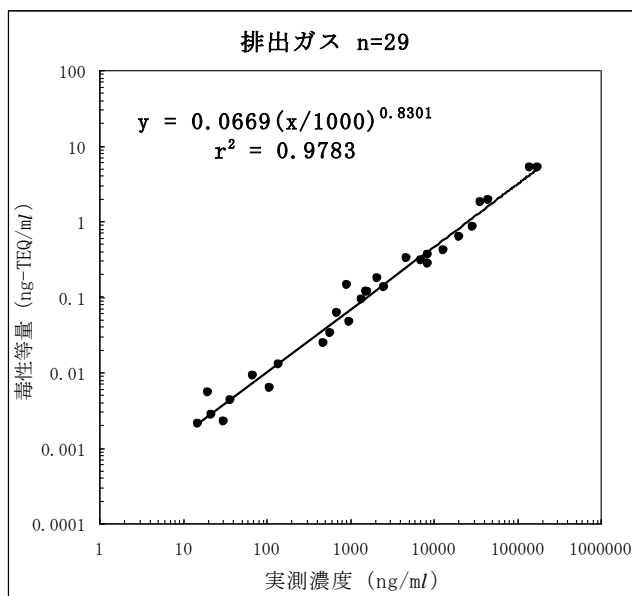



図 4-1-12 換算係数算出(例)(排出ガス)

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

濃度既知の試料（この例では n=27、n=20 以上が望ましい）を本測定方法により測定し得られた実測濃度(ng/mL)と、HRGC/HRMS 法により測定し得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/mL)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した（図 4-1-13 参照)。

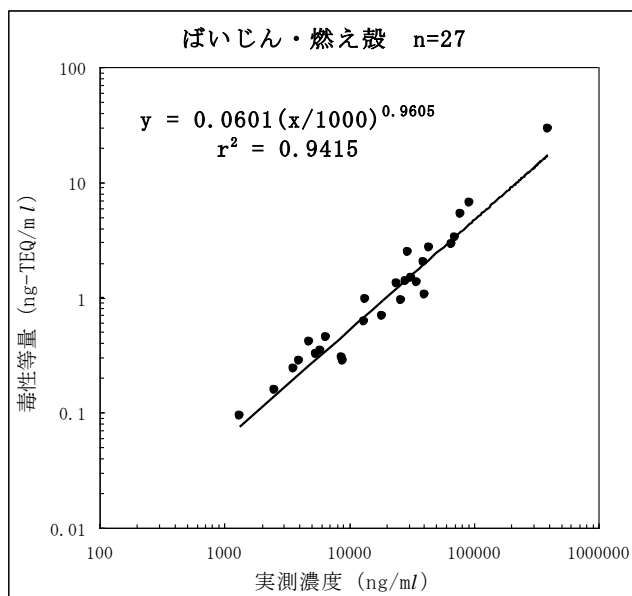



図 4-1-13 換算係数算出(例)(ばいじん及び燃え殻)

その２　前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び酵素標識抗原を用いた直接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 2)

第１節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた直接競合酵素免疫測定法による測定により定量する。試料採取から測定値確定までのフローの例を図4-2-1に示す。

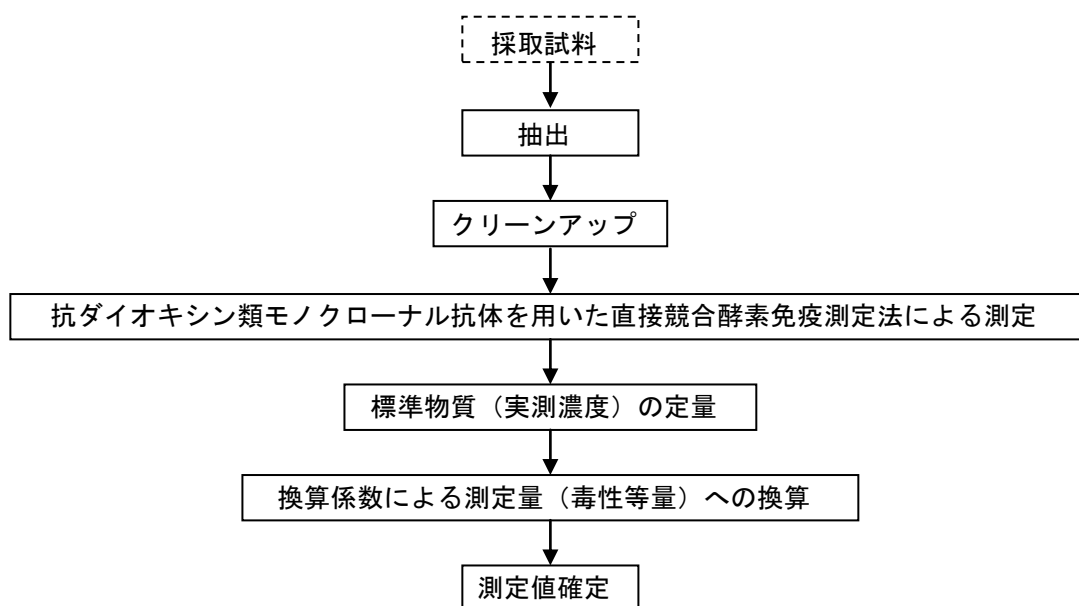



図4-2-1　試料採取から測定値確定までのフローの例

第２節 用語の定義

1) **抗ダイオキシン類抗体**　抗ダイオキシン類抗体産生マウス細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させることで自律増殖能を持ったハイブリドーマを作製し、単一の抗体産生細胞を選択する。ここではこの抗体産生細胞により得られる、ダイオキシン類に特異的に反応する性質を有するマウスモノクローナル抗体を指す。
2) **免疫反応試薬**　磁性ビーズに固定化された抗ダイオキシン類抗体とアルカリ性ホスファターゼ標識抗原とが、凍結乾燥体として試薬カップに封入されている。
3) **直接競合酵素免疫測定法**　サンプル中に含まれる微量の目的物質を、酵素標識した抗原と固体化した抗体を用い、直接抗原抗体反応を行って目的物質を測定する方法。
4) **蛍光物質の生成速度**　酵素基質として4-メチルウンベリフェリルりん酸を一定量添加し、酵素反応により生成した蛍光物質（4-メチルウンベリフェロン）の蛍光強度を落射型蛍光光度計を用いて、励起波長363 nm、蛍光波長447 nmで測定し、蛍光物質の生成速度（nmol/(L・s)、或いはRate値）を磁気撹拌下に37℃で5分間測定して、実測濃度（標準物質濃度に換算された濃度）を算出する。

5) B/B_0　測定対象について得られた蛍光物質の生成速度の平均値（B）を標準物質濃度ゼロの蛍光物質の生成速度の平均値（B_0）で割った%値。

6) 精度プロファイル　精度確認用コントロール濃度と変動係数（CV%）との関係図。

7) TCAP　抗ダイオキシン類抗体に反応する化合物。5-オキソ-5-[(2,4,5-トリクロロフェニル)アミノ]ペンタン酸であり、検量線を作成するための標準品として使用される。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1）で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times v}{k} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V　：　測定に必要な最小の試料ガスの量（m^3N）

Q_{DL}　：　標準物質における検出下限（ng-TCAP/mL, DMSO 溶液中）

k　：　測定量（毒性等量）への換算係数

v　：　測定用試料の液量（mL）

V_E　：　抽出液量（mL）

V'_E　：　抽出液分取量（mL）

C_{DL}　：　必要となる試料ガスにおける検出下限（ng-TEQ/m^3N）

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5 ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17 ng-TEQ/m^3N）

抽出液を 20 mL に定容し、その抽出液から 10 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.5 mL の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。

なお、標準物質における検出下限は 26.3×10^3 ng-TCAP/mL、排出ガスの測定量への換算係数は、200.6×10^3 を用いた。換算係数は以下により求めた。

(1)　本測定方法による実測濃度を Y、HRGC/HRMS 法による毒性等量を X とし、Y/X を求める。

(2)　全試料について Y/X を求め、全試料の幾何平均値を換算係数とする。

$$V = \frac{26.3 \times 10^3 \times 0.5}{200.6 \times 10^3} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.77 {m^3}_N$$

２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1）で決定した濃度の 1/30 以下にばいじん及び燃え殻試料における検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times v}{k} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W ： 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量（g）

Q_{DL} ： 標準物質における検出下限（ng-TCAP/mL, DMSO 溶液中）

k ： 測定量（毒性等量）への換算係数

v ： 測定用試料の液量（mL）

V_E ： 抽出液量（mL）

V'_E ： 抽出液分取量（mL）

C_{DL} ： 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限（ng-TEQ/g）

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）3 ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合（必要となる試料における検出下限は 0.1 ng-TEQ/g）

抽出液を 10 mL に定容し、その抽出液から 10 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.5 mL の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を以下に示す。

なお、標準物質における検出下限は 26.3×10^3 ng-TCAP/mL、排出ガスの測定量への換算係数は、175.5×10^3 を用いた。換算係数は以下により求めた。

(1) 本測定方法による実測濃度を Y、HRGC/HRMS 法による毒性等量を X とし、Y/X を求める。

(2) 全試料について Y/X を求め、全試料の幾何平均値を換算係数とする。

※ばいじん及び燃え殻の換算係数に差は認められないため、両試料を合わせた換算係数を採用する。

$$W = \frac{26.3 \times 10^3 \times 0.5}{175.5 \times 10^3} \times \frac{10}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.749g$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図4-2-2に採取試料の抽出から前処理までのフローの例を示す。

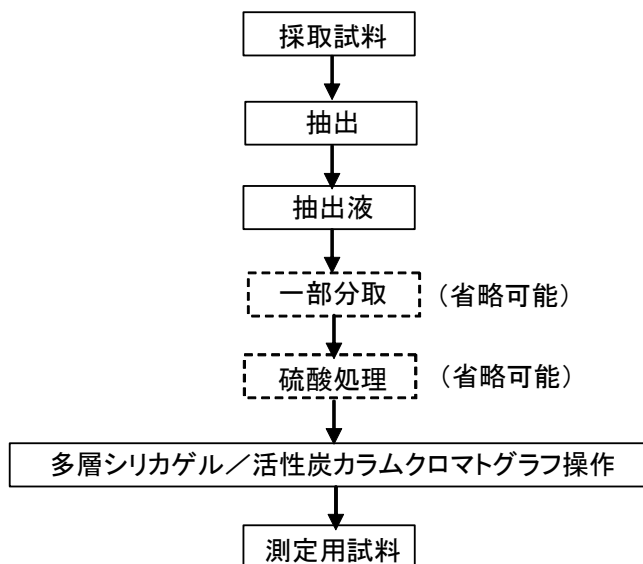



図4-2-2　採取試料の抽出から前処理までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1) **水**　JIS K0557 に規定する A4（又は A3）の水、又は同等の品質のもの
2) **アセトン**　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3) **トルエン**　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4) **ジクロロメタン**　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5) **ヘキサン**　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6) **ジメチルスルホキシド（DMSO）**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの（注１）
7) **硫酸ナトリウム**　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
8) **デカン**　測定に支障の無い品質のもの
9) **硫酸**　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
10) **多層シリカゲルカラム**　JIS K0311 に規定されたシリカゲル類と同等の分離性能を有するもの
11) **活性炭カラム**　活性炭を分散させたシリカゲル、又はこれと同等の分離性能を持つもの
12) **円筒ろ紙**　ソックスレー抽出に用いる。ガラス製又は石英製で、必要量の風乾した試料が入るサイズのもの。使用に先立ってアセトン洗浄し、さらにトルエン等でソックスレー抽出を行うか、又は 450℃以上で 4 時間以上加熱処理する

13) ガラス繊維ろ紙　孔径 0.5 μm 程度のもの、ブフナー漏斗に用いる

14) 窒素　JIS K1107 に規定する高純度窒素 2 級

（注１） ジメチルスルホキシド（DMSO）の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には注意する。

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及びJIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの、又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナーダニッシュ濃縮器(KD)、ロータリーエバポレータ又は遠心エバポレータ。接続部にグリース**を使用してはならない**

3.4 その他

吸引ポンプ、最高使用圧力が0.25 MPaの真空ポンプ、又は同等の性能を有するもの

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 4-2-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

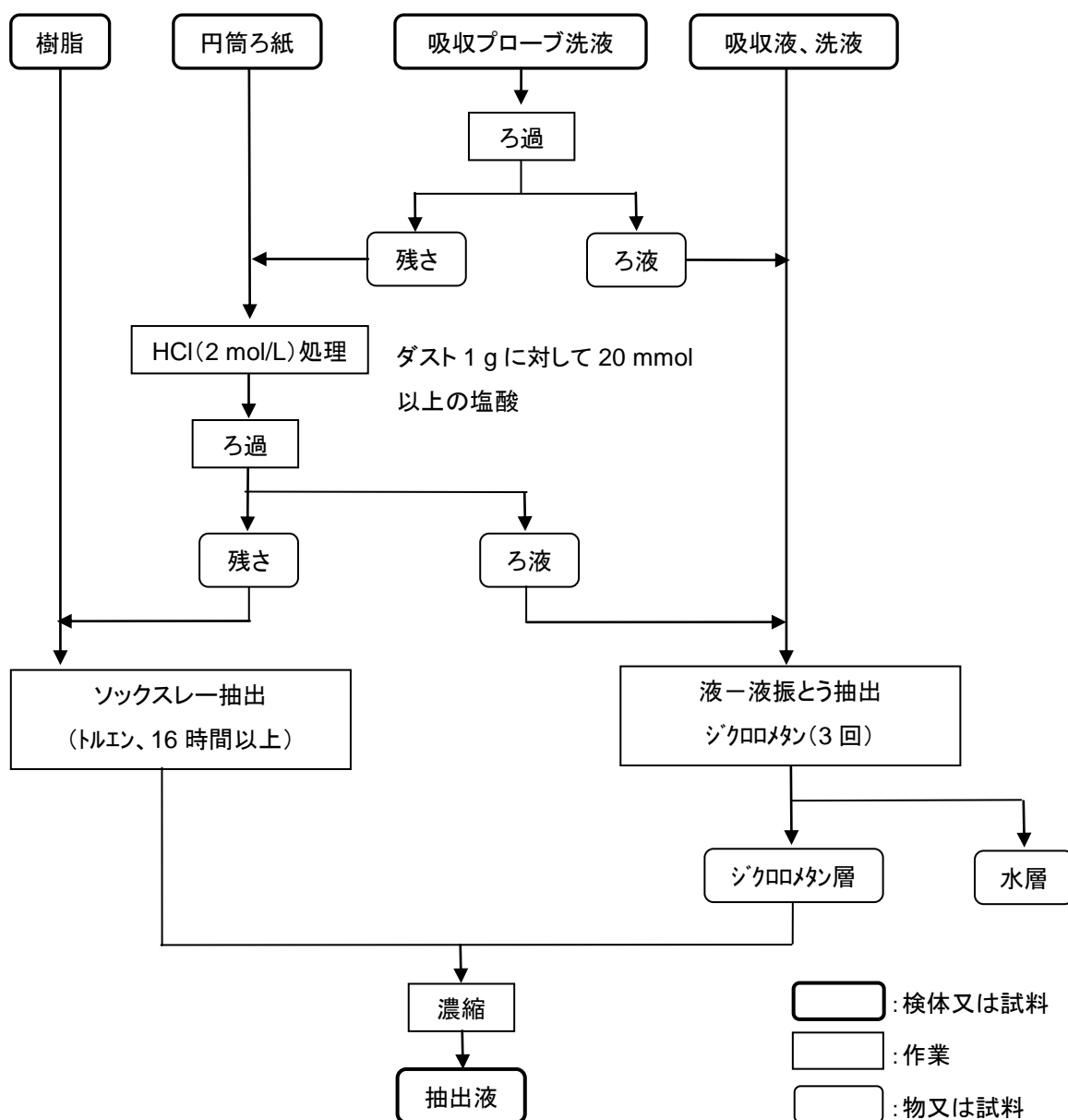



図4-2-3　排出ガス試料の抽出液調製フローの例

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一（第一号関係）(2)又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 4-2-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

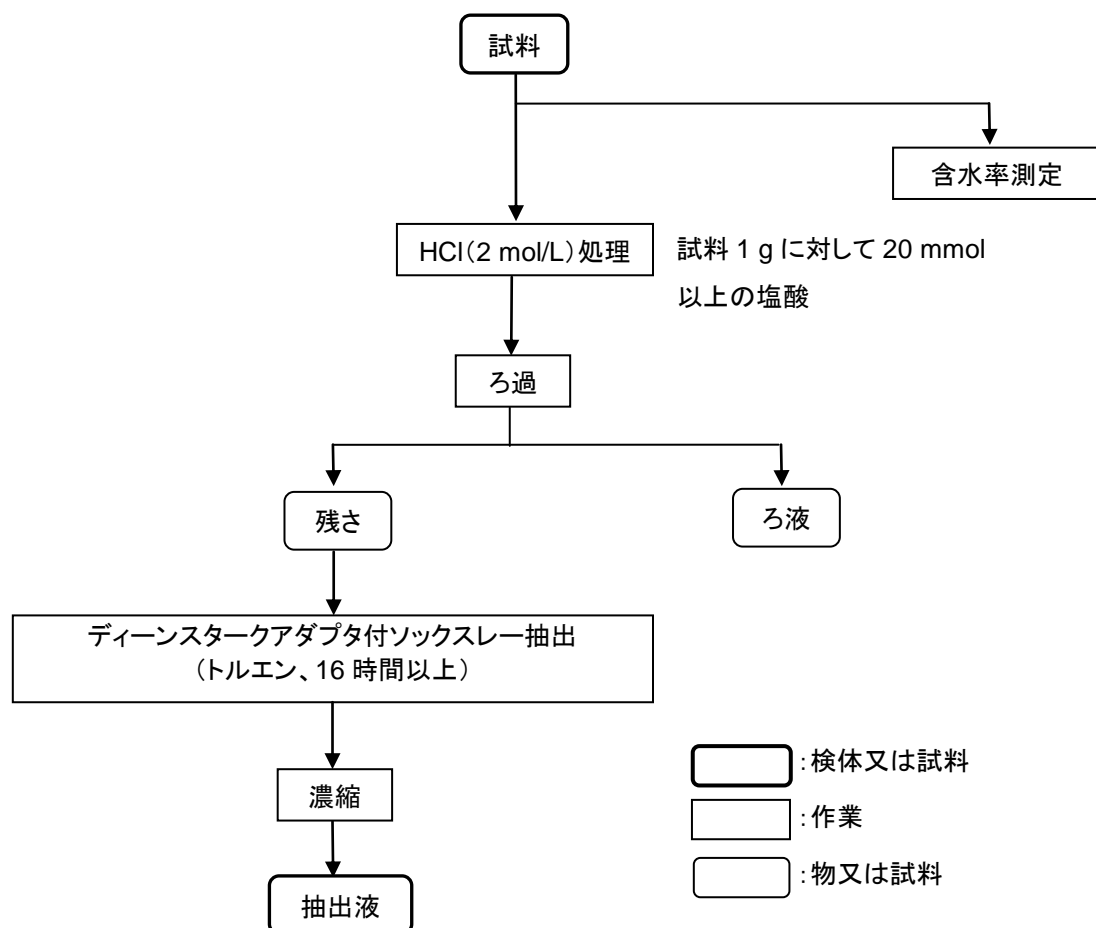



図4-2-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

4.3 クリーンアップ

図4-2-5にクリーンアップフローの例を示す。

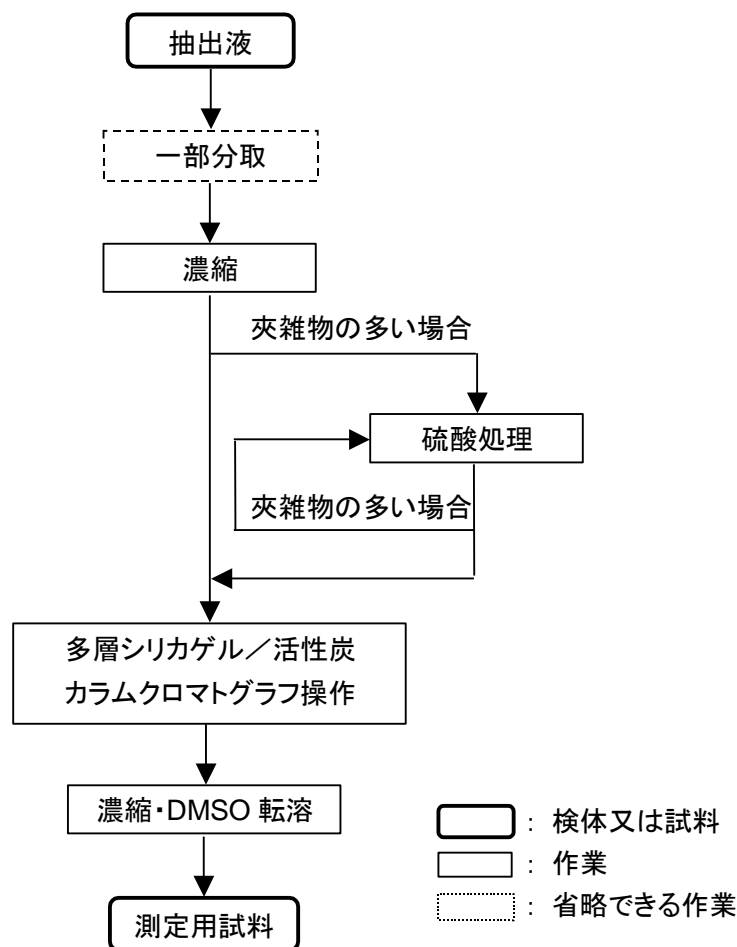



図4-2-5　クリーンアップのフローの例

1) 抽出液の分取

(1) 抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。

(2) あらかじめ、デカン 0.3 mL をいれた受器に適量の抽出液を入れ、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。

2)　精製カラムの作製

(1)　多層シリカゲルカラム

ガラスクロマト管（内径 15 mm）に、図 4-2-6 に示すように、下から乾式充填法でフリット、硝酸銀シリカゲル（1.5 g 程度)、シリカゲル（1.5 g 程度)、硫酸[44%（質量分率）]シリカゲル（7.5 g 程度)、シリカゲル（2.5 g 程度)、硫酸ナトリウム（2.5 g 程度)、フリットの順に積層する。

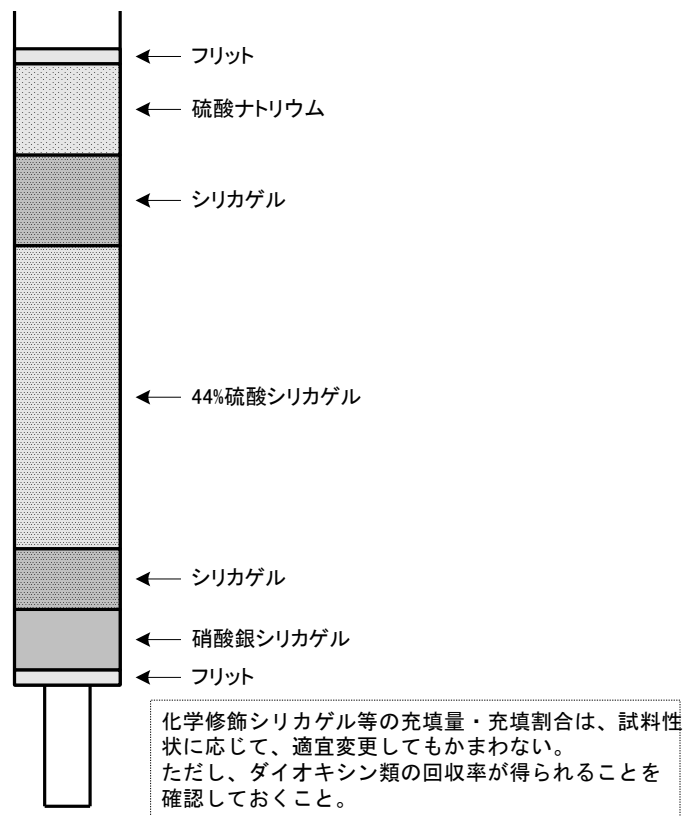



図 4-2-6　多層シリカゲルカラムの例

(2)　活性炭カラム（注 2）

ガラスクロマト管（内径 6 mm）に下から乾式充填法でフリット、硫酸ナトリウム（厚さ約 10 mm）、活性炭分散シリカゲルを 0.3 ± 0.01 g、硫酸ナトリウム（厚さ約 10 mm）、フリットの順に積層する。

（注 2）　活性炭は製造ロットによって、品質変動が考えられるため、内部標準物質（クリーンアップスパイク）を用いて、ロットが変わるたび、添加回収を HRGC/HRMS 法により確認しておくことが望ましい。

3)　クリーンアップ

(1) 硫酸処理

JIS K0311「6.4.4 硫酸処理/シリカゲルカラムクロマトグラフ操作又は多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作」に準拠した方法。

(2) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ／活性炭カラムクロマトグラフ操作

a) 活性炭カラムの上に多層シリカゲルカラムをテフロン製ユニオンで連結し、真空ポンプで脱気した後、ヘキサンを充填する。

b) 濃縮液にヘキサン 1 mL を加え攪拌した後、多層シリカゲルカラムに試料を添加する。

c) ヘキサン 1 mL で抽出液の入っていた容器を洗浄し、洗液をカラムに注入する。

d) ヘキサン 1 mL で同様の操作を行う。

e) カラムにヘキサン 45 mL を流す。

f) 多層シリカゲルカラムを外し、活性炭カラムにトルエン：ヘキサン＝1：9 (v:v)を 40 mL 流す。

g) 活性炭カラムを逆向きにして、トルエン 30 mL を流す。

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3）で得られた溶出液をロータリーエバポレータ等の濃縮器で1 mL程度まで濃縮する。

(2) 濃縮液をガラス試験管（スピッツ形状）に移し、窒素気流下で乾固寸前まで濃縮し、DMSOを0.5 mL加え撹拌する。

(3) 試料をバイアルに移し、密栓後、室温で暗所に保存する。

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類の毒性等量との相関性の高い、五塩化ジベンゾフラン類及び六塩化ジベンゾフラン類と特異的に反応する磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び酵素標識抗原を用いた直接競合酵素免疫測定法によりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

5-オキソ-5-[(2,4,5-トリクロロフェニル)アミノ]ペンタン酸（TCAP）を用いて検量線を作成し、試料の蛍光物質の生成速度から算出した実測濃度（標準物質濃度に換算された濃度）を排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数で除することにより測定量(毒性等量)を算出する。

２．使用キット、試薬、器具及び装置

2.1 使用キット

使用キット（磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類モノクローナル抗体には、マウス由来の融合細胞（ハイブリドーマ）から収得した五塩化ジベンゾフラン類及び六塩化ジベンゾフラン類を特異的に認識する抗体を、酵素標識抗原には、アルカリ性ホスファターゼで標識された２，４，５－トリクロロフェノール誘導体を、検量線作成用標準品には、TCAP を使用する。）は、以下の試薬等から構成されるものである。

1) 免疫反応試薬（100テスト分/箱）

試薬カップ20個がひとつの試薬カップトレイに並び、アルミ製の防湿袋に納められている。1回測定分（試薬カップ1個）には凍結乾燥状態で主成分として抗ダイオキシン類抗体固定化ビーズおよびアルカリ性ホスファターゼ標識2,4,5-トリクロロフェノール誘導体が含まれている。

2) 標準品セット（標準品(1)～(6)　各 1 mL 入り各 2 本/箱）

ジメチルスルホキシド（DMSO）溶液であり、以下の濃度の 5-オキソ-5-[(2,4,5-トリクロロフェニル)アミノ]ペンタン酸（TCAP）を含む。

ダイオキシン類標準品(1)	0 μg/mL
ダイオキシン類標準品(2)	約　40 μg/mL
ダイオキシン類標準品(3)	約　120 μg/mL
ダイオキシン類標準品(4)	約　360 μg/mL
ダイオキシン類標準品(5)	約 1,100 μg/mL
ダイオキシン類標準品(6)	約 3,000 μg/mL

ダイオキシン類標準品(6)の濃度は約 3,000 μg/mL であるが、標準品セットのロットにより変動があるため、保障できる検量域の上限として 2,800 μg/mL とする。

3) 検体希釈液（4 mL 入り 4 本/箱）

0.01% Triton X-100 を含む水溶液で、標準品及び検体の希釈に適するように調製されている。

4) コントロールセット（レベル 1、レベル 2　各 4 mL 入り各 2 本/箱）

ジメチルスルホキシド（DMSO）溶液であり、以下の濃度の 5-オキソ-5-[(2,4,5-トリクロロフェニル)アミノ]ペンタン酸（TCAP）を含む。

ダイオキシン類コントロール　レベル 1　 約 180 μg/mL

ダイオキシン類コントロール　レベル 2　 約 360 μg/mL

5) 分注液（100 mL 入り 4 本/箱）

主成分として 1 びん（100 mL）あたり、プロクリン 300（保存剤）0.03 g を含む。

6) 洗浄液（100 mL 入り 4 本/箱）

主成分として 1 びん（100 mL）あたり塩化ナトリウム 0.88 g、サポニン 0.05 g を含む

7) 基質セット

基質（凍結乾燥品、100 mL 用 2 本/箱）:

主成分として 1 びんあたり 4-メチルウンベリフェリルりん酸 26 mg を含む

基質溶解液（100 mL 入り 2 本/箱）:

主成分として 100 mL あたり 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール 4.5 g を含む

2.2 試薬

測定に用いる使用キット以外の試薬は、次による。

1) 水　JIS K0557 に規定する A4（又は A3）の水、又は同等の品質のもの

2) ジメチルスルホキシド（DMSO）

JIS K9702 に規定するものまたは同等の品質のもの（注１）

（注１）　ジメチルスルホキシド（DMSO）の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には注意する。

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1)　酵素免疫測定装置

2)　ボルテックスミキサー（試験管ミキサー）

3)　冷蔵庫

4)　マイクロピペット（10～100μL、100～1,000μL）

5)　マイクロピペットチップ

6)　ガラス試験管（13 mmϕ X 100 mm：スピッツ形状）

7)　試験管用ラック

8)　酵素免疫測定装置用サンプルチップ（1,000 本/箱）

9)　検体処理用カップ（200 カップ/箱）

10)　検出器検定用カップ（200 カップ/箱）

11)　パスツールピペット

12)　電子天秤（計量範囲：0.001 g～約 200 g）

３．キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守すること。

1) ダイオキシン類の各試薬類は使用するまで 2～8℃で保存し、15～25℃に戻してから使用すること。

2) ダイオキシン類の有効期間は、未開封の場合は、遮光下、2～8℃保存で、製造日より 1 年間有効である。

(1) 免疫反応試薬　ダイオキシン類免疫反応試薬の防湿袋を開封して使用する。開封後は、15～25℃放置で1日、2～8℃保存で7日間有効である。

(2) 標準品　ダイオキシン類標準品セット（標準品(1)～(6)）及びコントロールセット（レベル1、レベル2）はジメチルスルホキシド（DMSO）溶液であり、DMSOの融点は18.5℃のため、使用の際には20～25℃に戻して融解、十分に混和してから使用する。標準品はいずれも、開封後は密封し15～25℃保存で1日間有効である。コントロールは、開封後は密封し15～25℃保存で30日間有効である。

(3) 検体希釈液　ダイオキシン類検体希釈液は液体なので、開封後15～25℃で使用する。開封後は密封し15～25℃保存で30日間有効である。

(4) 基質液　基質セット中の基質1びんに基質溶解液1びん（100 mL）を加えて基質液を調製する。調製後は、遮光下、15～25℃保存で3日間、2～8℃保存で7日間有効である（直射日光、紫外線に当てないように注意する）。

(5) 洗浄液　洗浄液を装置付属の洗浄液タンクに入れる。15～25℃放置で30日間有効である。

(6) 分注液　分注液を装置付属の分注液タンクに入れる。15～25℃放置で30日間有効である。

(7) 検体処理用カップ　検体処理用カップ（STCカップ）は酵素免疫測定装置の取扱説明書に従い、試薬カップアダプタにセットする。有効期限はないが、15～25℃で保存する。

3) キットを保管する場合は、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度の情報を記録し、保存すること。

４．測定操作

冷蔵（2～8℃）保存されている試薬類は、15～25℃に戻してから使用する。

4.1　免疫反応試薬

アルミ製の防湿袋（試薬カップ20個がひとつの試薬カップトレイに収納）を破り、試薬カップを取り出して使用する。

4.2　標準品セット

標準品セット及びコントロールセットはジメチルスルホキシド（DMSO）溶液であり、調製不要である。各標準品及びコントロールは20～25℃に戻してから開封して使用する。

4.3　その他の試薬・サンプルチップ

分注液、洗浄液、基質液、検体希釈液及び酵素免疫測定用サンプルチップは調製不要である。酵素免疫測定装置の取扱説明書に従いセットする。

4.4　試料希釈系列の調製

前処理の後、DMSO溶液とした試料は、適宜、DMSOにより希釈する。TEQ濃度が全く未知の試料の場

合、1例として、原液、3倍希釈液、9倍希釈液、27倍希釈液、及び81倍希釈液の5水準濃度の測定を行う（表4-2-1）。希釈にはガラス容器を用いる。

表4-2-1　試料の希釈例

	希釈元（μL）	DMSO（μL）
1倍	原液	0
3倍	原液　100	200
9倍	3倍希釈液　100	200
27倍	9倍希釈液　100	200
81倍	27倍希釈液　100	200

4.5　標準品の測定

標準品セット中の各標準品はジメチルスルホキシド（DMSO）溶液であり、20～25℃に戻してから開封し、酵素免疫測定装置にセットする。標準品は検体希釈液にて自動希釈され、20% DMSO標準液(1)～(6)が調製される。調製された各20% DMSO標準液50μL及び分注液各50 μLは自動的に免疫反応試薬の試薬カップに分注され免疫反応が開始される。各標準液(1)～(6)を三重測定して得られる各標準液の蛍光物質の生成速度の平均を求める。得られた蛍光物質の生成速度の平均値（B）を標準液(1)の蛍光物質の生成速度の平均値（B_0）で割った%値（B/B_0とし、この値をyとする）と各標準液の濃度（xとする）を元にLogit-Log三次回帰式により検量線を作成する。

1) 酵素免疫測定装置の取扱説明書に従い、日常点検を実施する。

2) 酵素免疫測定装置の取扱説明書に従い、以下の登録を行う。標準品(1)～(6)の各濃度、及び標準品測定プログラムを酵素免疫測定装置に登録する。

3) 標準品(1)～(6)はジメチルスルホキシド（DMSO）溶液である。DMSO の融点は 18.5℃であるので、使用の際には 20～25℃に戻して融解し、十分に混和してからガラス試験管（13 mmφ X 100 mm：スピッツ形状）に約 300μL 移し変える。

4) 以下の図 4-2-7 に記載してあるように、標準品を移し変えたガラス試験管（図中の標 1～標 6）、検体処理用カップ（図中の処理）1 個及びダイオキシン類 免疫反応試薬の試薬カップ（図中の免疫）3 個の順番で酵素免疫測定装置にセットし（検体処理用カップ計 6 個、ダイオキシン類 免疫反応試薬の試薬カップ計 18 個）、各標準品を 3 重測定する。

なお標準品は、標準品(1)から低い濃度順に並べる必要がある。

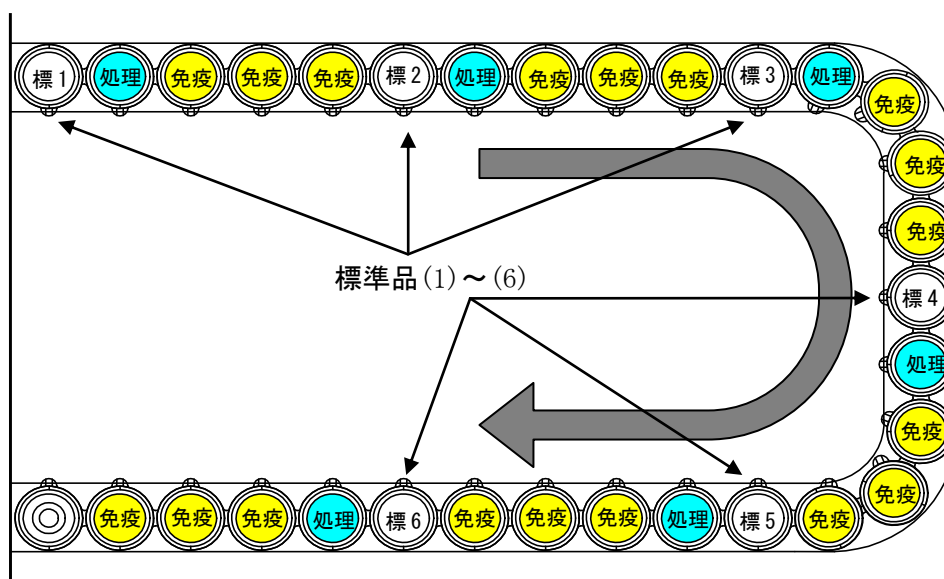



図 4-2-7　検量線作成時の試験管、検体処理用カップ、免疫反応試薬カップ設置の例

5) 測定を開始すると、各標準品 DMSO 溶液 40 μL および検体希釈液 160 μL が検体処理用カップ(図中の処理)に分注され、サンプルチップにより吸引吐出して十分に混和する事により 5 倍希釈液が自動的に調製される。希釈された 20% DMSO 標準液(1)～(6)各 50 μL 及び分注液各 50μL が免疫反応試薬の試薬カップ（図中の免疫）に分注され抗原抗体反応が開始する。磁気撹拌下に抗原抗体反応を 10 分間、37℃で行った後、洗浄液で洗浄することにより遊離の酵素標識抗原と検体成分を除去し、その後、磁性ビーズに結合した酵素の活性を測定するため、酵素基質を添加し、磁気撹拌下に 37℃で 5 分間測定することにより、酵素反応の結果得られる蛍光物質の生成速度を求める。なお、測定開始から結果出力までは装置にて自動的かつ連続的に行われる。

6) 測定開始後、約 20 分で最初の測定結果が出力され、その後 1 分ごとに 1 つずつ結果が報告される。

4.6　コントロール及び検体の測定例

1) 酵素免疫測定装置の取扱説明書に従い、コントロール測定プログラムを酵素免疫測定装置に登録する。

2) コントロール　レベル 1 およびレベル 2 はジメチルスルホキシド（DMSO）溶液である。DMSO の融点は 18.5℃であるので、使用の際には 20～25℃に戻して融解し、十分に混和してからガラス試験管（13 mmφ×100 mm：スピッツ形状）に約 300 μL を移し変える。

3) 検体（原液及び希釈された系列試料）をガラス試験管（13 mmφ×100 mm：スピッツ形状）に約 300μL 移し変える。

4) 図 4-2-8 に記載してあるように、コントロールを移し変えたガラス試験管（図中のコ 1 とコ 2）、検体処理用カップ（図中の処理）1 個及びダイオキシン類 免疫反応試薬の試薬カップ（図中の免疫）1 個の順番で酵素免疫測定装置にセットし（検体処理用カップ計 2 個、ダイオキシン類 免疫反応試薬の試薬カップ計 2 個）、各コントロールを 1 重測定する。（注 2）

5) 検体を移し変えたガラス試験管（図中の検 1）、検体処理用カップ（図中の処理）1 個及びダイオキシン類 免疫反応試薬の試薬カップ（図中の免疫）1 個の順番で酵素免疫測定装置にセットし検体を 1 重測定する。

6) 測定した検体の中で B/B_0 が 50%に最も近い検体を更に 2 重測定する。

7) 得られた合計 3 回の検体測定結果の平均値を得る。

（注 2） コントロールの測定は測定日ごとに 1 回実施する。

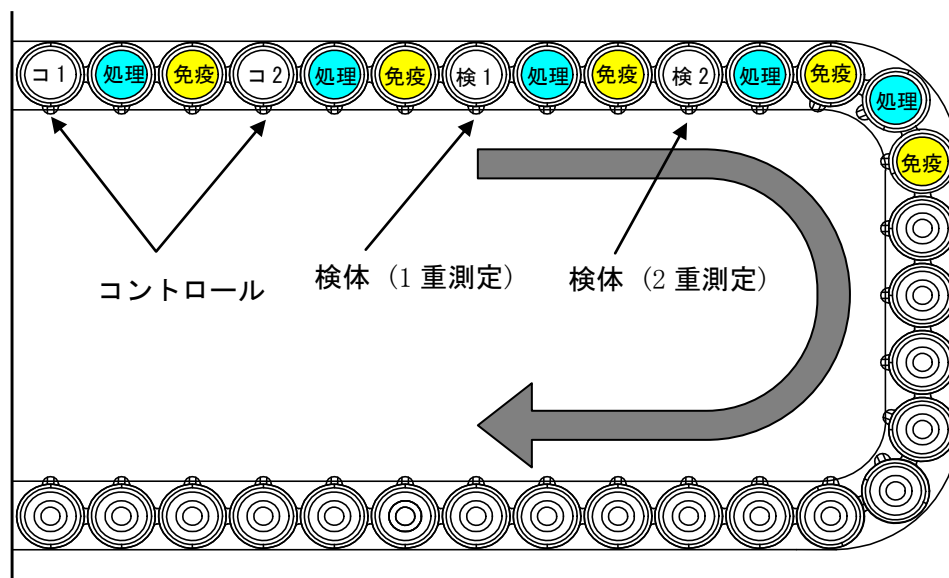



図 4-2-8 コントロール、検体時の試験管、検体処理用カップ、免疫反応試薬カップ設置の例

5．定量

5.1 検量線の作成

1) 標準品(1)～(6)の測定から得られた各標準品(2)～(6)の蛍光物質生成速度の平均値(B)を標準品(1)の蛍光物質の生成速度の平均値(B_0)で割った%値（B/B_0 とし、この値を y とする）と各標準品の濃度（x とする）を元に、Logit-Log 三次回帰式により検量線を作成する。Logit-Log 三次回帰式とは以下の重回帰式を示す。

$Y = A X^3 + B X^2 + C X + D$ 又は

$\mathrm{Logit}\ y = A [\mathrm{Log}\ (x/5)]^3 + B [\mathrm{Log}\ (x/5)]^2 + C [\mathrm{Log}\ (x/5)] + D$

Y：Logit y、 y：B/B_0、 A, B, C, D：係数

X：Log (x/5)、 x：標準物質の濃度 [μg/mL]

2) 検量線の有効期間は 60 日間であり、ダイオキシン類 免疫反応試薬の同一ロットのみに適用される。検量線作成から 60 日経過した場合、コントロール値が表示濃度範囲を逸脱した場合、免疫反応試薬のロット変更をする場合、もしくは蛍光ランプの交換等の場合には、再度上記手順に従って検量線を作成する。

3) 測定操作により得られる検量線の例を図 4-2-9 に、標準品測定結果及び B/B_0 の例を表 4-2-2 に示す。

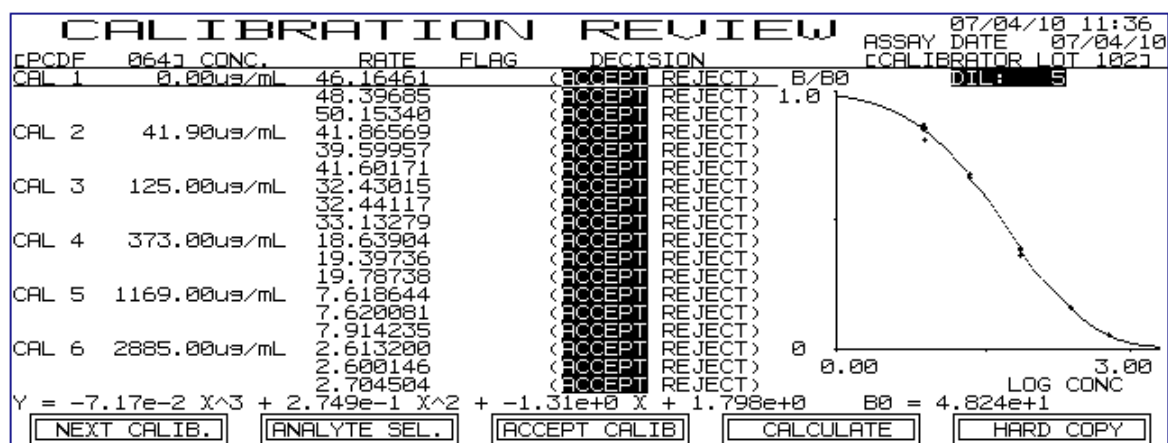



図 4-2-9　酵素免疫測定装置から出力された検量線の例

表 4-2-2　図 4-2-9 の結果得られる再現性及び B/B_0 の例

TCAP 標準物質濃度 (μg/mL)		Rate 値*	平均値	SD	CV	B/B_0
1	0.0	46.16	48.24	2.00	4.1%	100%
	0.0	48.40				
	0.0	50.15				
2	41.9	41.87	41.02	1.24	3.0%	85%
	41.9	39.60				
	41.9	41.60				
3	125.0	32.43	32.67	0.40	1.2%	68%
	125.0	32.44				
	125.0	33.13				
4	373.0	18.64	19.27	0.58	3.0%	40%
	373.0	19.40				
	373.0	19.79				
5	1,169.0	7.62	7.72	0.17	2.2%	16%
	1,169.0	7.62				
	1,169.0	7.91				
6	2,885.0	2.61	2.64	0.06	2.2%	5%
	2,885.0	2.60				
	2,885.0	2.70				

*：蛍光物質の生成速度であり、nmol/(L・s)で表す。

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

精度管理の例（同時再現性）

1) 「４．測定操作」に従い検量線を作成する。次に、コントロール　レベル 1 又はレベル 2 を同時に各々10 回測定し、コントロール濃度を算出する。なお、同時再現性による精度管理には、コントロールを同時に 2 回以上測定することが望ましい。ただし、酵素免疫測定装置設置時或いは修理後の検収には、コントロールを同時に 10 回測定することが望ましい。

2) 得られたコントロール濃度（μg/mL）を管理図に記録し保存する。

3) 各コントロール測定値の平均（M）と標準偏差（SD）を算出し、±2SD を管理限界とする。変動係数（CV）は 20%以内に収まることが望ましい。結果の例を表 4-2-3 および管理図の例を図 4-2-11

に示す。

表 4-2-3　コントロール　レベル 1 及びレベル 2 の測定結果の例

		コントロール　レベル 1	コントロール　レベル 2
検量線上の結合比	B/B_0（%）	63.9	46.6
平均値	M(μg/mL)	183.3	357.5
測定値の標準偏差	SD(μg/mL)	7.35	16.43
測定値の変動係数	CV%	4.01	4.60
管理限界	M±2SD	168.6～198.0	324.6～390.4

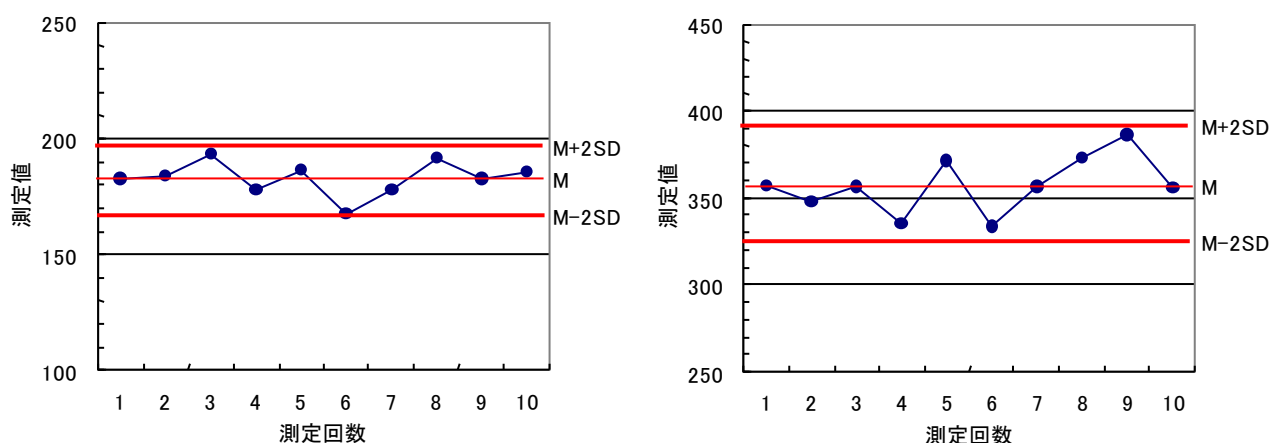



図4-2-10　表4-2-3で得られたコントロール　レベル1及びレベル2の管理図の例

4) 1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明を行い、再測定する。原因究明に基づいて講じた措置および再測定の結果を記録する。

5.3　測定試料の定量

B/B_0が 50%に最も近い試料の測定結果（DMSO 溶液中の実測濃度）を平均する。求めた濃度（μg-TCAP/mL）から以下の式によって試料量あたりの実測濃度を求める。

1) 排出ガス

$$C_S = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、　Cs　：　排出ガス中の実測濃度（μg-TCAP/m^3N）

X　：　希釈試料中実測濃度（μg-TCAP/mL）

n　：　希釈倍率

v　：　測定用試料の液量（mL）

V_E　：　抽出液量（mL）

V'_E　：　抽出液分取量（mL）

V　：　排出ガス試料の採取量（m^3N）

（備考）排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、 C ： 酸素の濃度 On における実測濃度（ng/m^3N）

Os ： 排出ガス中の酸素の濃度（注 3）（%）

Cs ： 排出ガス中の実測濃度（ng/m^3N）

（注 3）排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os = 20 とする。

2) ばいじん及び燃え殻

$$C_w = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W}$$

ここに、 Cw ： ばいじん及び燃え殻中の実測濃度（μg-TCAP/g）

X ： 希釈試料中実測濃度（μg-TCAP/mL）

n ： 希釈倍率

v ： 測定用試料の液量（mL）

V_E ： 抽出液量（mL）

V'_E ： 抽出液分取量（mL）

W ： ばいじん及び燃え殻試料の採取量（g）

６．検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲の確認

標準物質における検出下限及び定量範囲の確認は、定量値の変動係数（CV%）が 30%以下となる濃度を検出下限とし、20%以下となる上下 2 点間の濃度を定量範囲とする方法で行う。

以下に、ダイオキシン類試薬を用いて n = 10 で測定した例を示す。

1) 検出下限及び定量範囲算出用標準物質溶液の調製

(1) 標準品(1)～(6)及び標準品(1)と(2)の間の濃度を標準品(2)と標準品(1)を用いて調製する。

(2) 調製した標準物質溶液の濃度の例を以下の表 4-2-4 に記載する。

表 4-2-4 検出下限及び定量範囲算出用標準物質溶液の調製例

単位	標準品(1)	希釈 1	希釈 2	希釈 3	標準品(2)	標準品(3)	標準品(4)	標準品(5)	標準品(6)
μg/mL	0.0	13.0	20.8	28.1	42.9	126.3	377.8	1,116.6	3,318.6

2) 検出下限及び定量範囲の算出

(1) 標準品(1)～(6)を用いて検量線を作成する。

(2) 標準品(2)～(6)及び標準品(1)と(2)の間の濃度の希釈液 1～3 を n = 10 で測定し、結果を得る。

(3) 各濃度域における測定値の平均値、標準偏差（SD）及び変動係数（CV%）を算出する。各濃度について、5 回以上測定することが望ましい。

(4) 検出下限及び定量範囲算出用測定結果の例を表 4-2-5 に示す。

表 4-2-5　検出下限及び定量範囲算出用測定結果の例

名称	表示濃度(μg/mL)	測定結果（μg/mL）					平均	SD	CV %
希釈液 1	13.0	1.7	13.8	8.6	11.3	16.1	9.8	7.10	72.3
		ND	6.9	2.5	4.2	23.4			
希釈液 2	20.8	7.2	18.5	22.0	14.8	11.2	18.9	6.98	36.9
		18.1	25.2	24.9	16.7	30.5			
希釈液 3	28.1	27.5	41.5	19.0	37.8	31.0	27.2	8.81	32.4
		24.2	12.9	32.6	25.2	19.8			
標準品(2)	42.9	35.0	52.6	34.5	48.5	39.2	45.0	7.41	16.4
		48.9	45.4	57.3	46.9	42.0			
標準品(3)	126.3	116.7	120.5	130.9	111.1	131.7	127.6	14.54	11.4
		117.2	157.8	146.3	122.4	121.7			
標準品(4)	377.8	391.3	376.4	373.9	401.8	380.7	385.6	10.69	2.8
		405.0	376.4	381.0	384.4	385.5			
標準品(5)	1,116.6	1,159.9	1,179.2	1,194.3	1,167.9	1,166.0	1,165.0	20.90	1.8
		1,121.4	1,156.5	1,149.7	1,165.5	1,190.0			
標準品(6)	3,318.6	3,219.4	3,390.5	3,400.0	3,487.0	3,359.3	3,386.8	113.29	3.4
		3,501.0	3,178.1	3,496.7	3,472.3	3,364.1			

ND:Not Detected（検量線の回帰式から濃度を計算されず）

横軸に表示濃度（μg/mL）、縦軸に変動係数（CV%）をプロットした精度プロファイル図を作成する。

(5) 精度プロファイルの例を図 4-2-11 に示す。

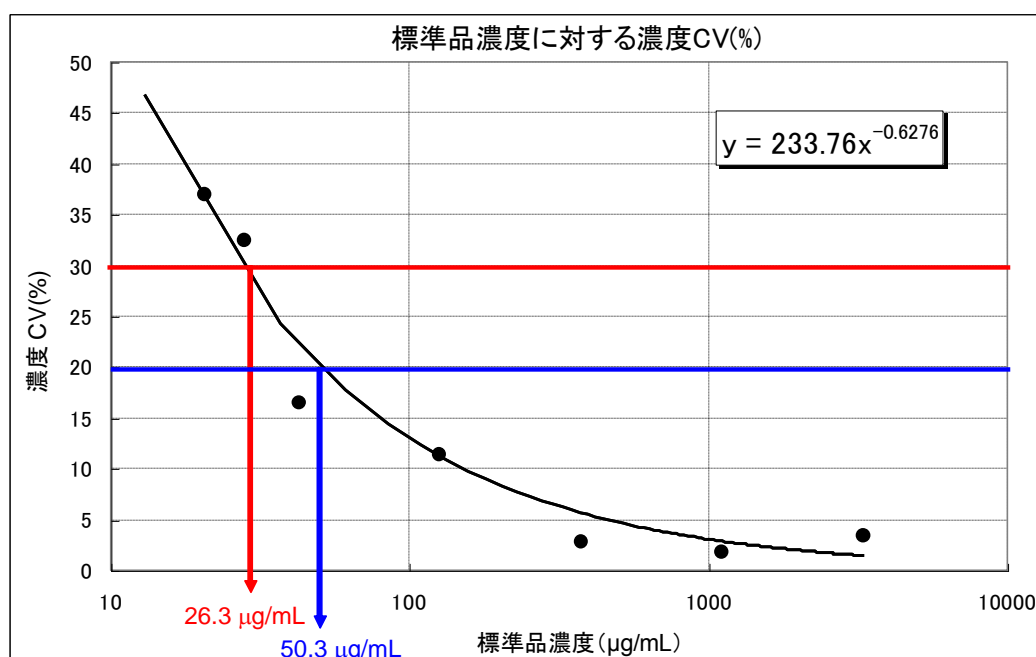



図 4-2-11　精度プロファイルの例（標準品及び希釈液）

(6) 精度プロファイル図から、変動係数 30%の濃度を検出下限、20%となる上下 2 点間の濃度範囲を定量範囲とする。

(7) 本法により算出した検出下限及び定量範囲は、酵素免疫測定に供する DMSO 溶液 1 mL 中の標準物質相当量（μg/mL）である。

最終的に 1 mL に定容した DMSO 溶液試料 10 µL 及び検体希釈液 40 µL の混合溶液 50 µL と、分注液 50 µL の計 100 µL を免疫反応試薬の試薬カップに分注するため、1 カップ当たりの試料分注量は 10 µL となる。上記方法から算出したダイオキシン類試薬の検出下限を表 4-2-6 に、定量範囲を表 4-2-7 に示す。

表 4-2-6　標準物質による検出下限

標準物質における検出下限	
263 ng-TCAP/カップ	26.3 µg-TCAP/mL

表 4-2-7　標準物質による定量範囲

標準物質における定量範囲	
0.503～28.0 µg-TCAP/カップ	50.3～2,800µg-TCAP/mL

6.2 試料における検出下限及び定量下限の確認

1) 排出ガス

(1) 「第３節 試料採取方法に関する特記事項　１．試料ガスの採取量」で記載した計算式から、試料ガスの採取量を 1.0 m^3N とし、抽出液を 10 mL に定容し、その抽出液から 10 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.5 mL の測定用試料溶液に調製する場合の検出下限を求めると、0.066 ng-TEQ/m^3N となる。

(2) 同様に定量範囲を求めると、表 4-2-8 のように 0.13～7.0 ng-TEQ/m^3N となる。但し、実際は転溶した試料から希釈用 DMSO を用いて、5 水準の 3 倍希釈系列（最大 81 倍）を調製するため、定量範囲の上限は検量域上限の 81 倍（570ng-TEQ/m^3N）まで定量可能である。

表 4-2-8　排出ガス試料における検出下限と定量範囲

試料における検出下限	試料における定量範囲
0.066 ng-TEQ/m^3N	0.13～7.0 ng-TEQ/m^3N

2)　ばいじん及び燃え殻

(1) 「第３節 試料採取方法に関する特記事項　２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量」で記載した計算式から、ばいじん及び燃え殻の採取量を 1.5 g とし、抽出液を 10 mL に定容し、その抽出液から 10 mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.5 mL の測定用試料溶液に調製する場合の検出下限を求めると、0.050 ng-TEQ/g となる。

(2) 同様に定量範囲を求めると、表 4-2-9 のように 0.096～5.3 ng-TEQ/g となる。但し、実際は転溶した試料から希釈用 DMSO を用いて、5 水準の 3 倍希釈系列（最大 81 倍）を調製するため、定量範囲の上限は検量域上限の 81 倍（430 ng-TEQ/g）まで定量可能である。

表 4-2-9.　ばいじん及び燃え殻における検出下限と定量範囲

試料における検出下限	試料における定量範囲
0.050 ng-TEQ/g	0.096～5.3 ng-TEQ/g

７．測定量（毒性等量）への換算

5.3で求めた実測濃度を排出ガス、ばいじん及び燃え殻ともに換算係数で除することで測定量（毒性等量）に換算する。ここで、排出ガスの換算係数（「第３節 試料採取方法に関する特記事項　１．試料ガスの採取量」を参照）は$200.6×10^3$、ばいじん及び燃え殻の換算係数（「第３節 試料採取方法に関する特記事項　２．ばいじん及び燃え殻試料の採取量」を参照）は$175.5×10^3$である。

測定量（毒性等量）（ng-TEQ/m^3N、ng-TEQ/g）

= 実測濃度（μg-TCAP/m^3N、μg-TCAP/g）／換算係数

なお、測定結果の報告様式については、第２章第２節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも6ヶ月に1回、HRGC/HRMS法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第３節記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。具体的には、換算係数が100±30%を逸脱した場合、又は相関係数が0.9以下となった場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方についてHRGC/HRMS法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方はJIS K0311に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法４．測定操作及び５．定量に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成4年厚生省告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法４．測定操作及び５．定量に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

※ 毒性等価係数（TEF）は、WHO-TEF(2006)を採用した。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について（排出ガス試料）」

多数の排出ガス試料（この例ではn = 52。6ヶ月に1度n = 6以上測定）について本測定方法とHRGC/HRMS法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。本測定方法による実測濃度をHRGC/HRMS法による毒性等量で除したものの幾何平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

1）本測定方法による実測濃度をY、HRGC/HRMS法による毒性等量をXとし、Y/Xを求める。

2）全試料についてY/Xの値を求め、全試料の幾何平均値を計算し、これを換算係数とする（図4-2-12ではY/Xの平均値である200.6 × 10³を換算係数とした）。

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について（ばいじん及び燃え殻試料）」

多数のばいじん及び燃え殻試料（この例ではn = 57。6ヶ月に一度n = 6以上で測定）について本測定方法とHRGC/HRMS法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。本測定方法による実測濃度をHRGC/HRMS法による毒性等量で除したものの幾何平均値を換算係数とする。

(例) ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

1）本測定方法による実測濃度をY、HRGC/HRMS法による毒性等量をXとし、Y/Xを求める。

2）全試料についてY/Xの値を求め、全試料の幾何平均値を計算し、これを換算係数とする（図4-2-13ではY/Xの平均値である175.5 × 10³を換算係数とした）。

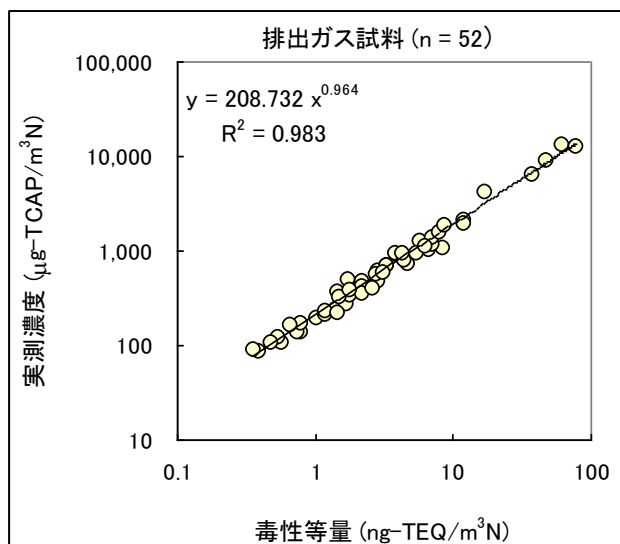



図4-2-12　換算係数算出（例）
（排出ガス）

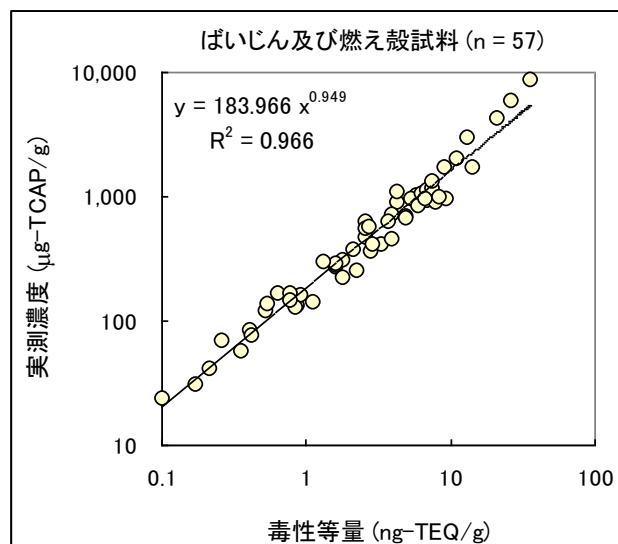



図4-2-13　換算係数算出（例）
（ばいじん及び燃え殻）

その３　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 3)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた間接競合酵素免疫測定法による測定により定量する。測定方法のフローを図 4-3-1 に示す。

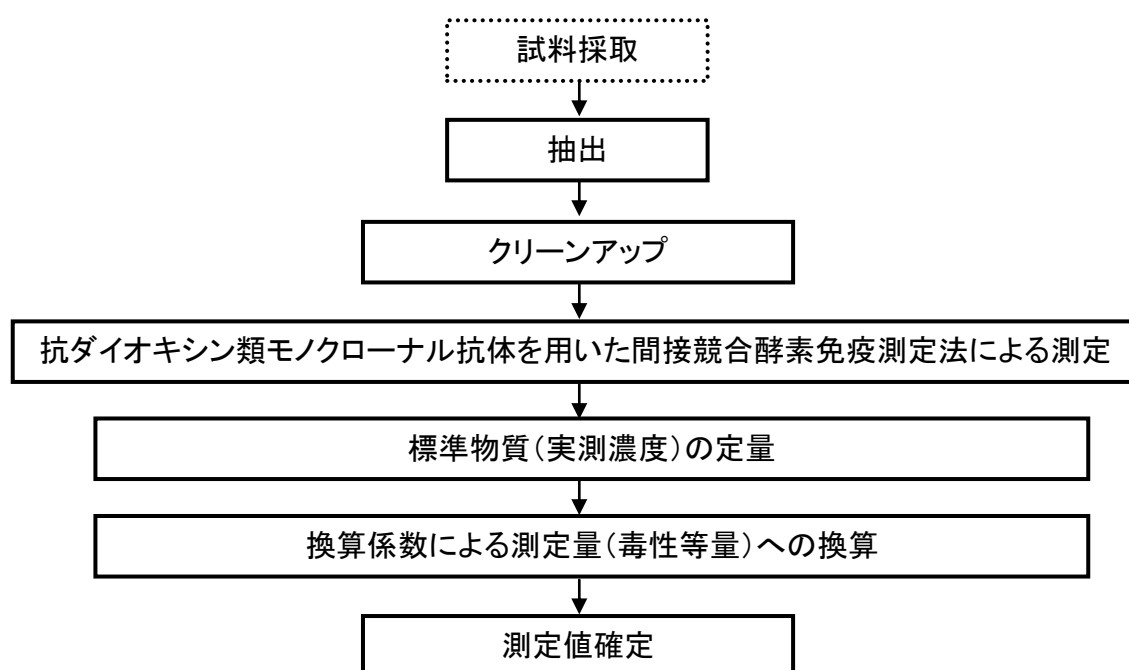



図 4-3-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **抗ダイオキシン類モノクロナール抗体**　ここではダイオキシン類似化合物とキャリアタンパク質の複合体を免疫することにより得られる抗ダイオキシン類抗体産生能を有する B 細胞と、マウス骨髄腫細胞（ミエローマ）を融合することにより作成したハイブリドーマから得られ、ダイオキシン類と特異的に反応する性質を有するモノクローナル抗体を指す。
2) **一次抗体溶液**　抗ダイオキシン類抗体を緩衝液中に溶解させたもの
3) **標識二次抗体溶液**　抗ダイオキシン類抗体の Fc 部位（不変部位）と特異的に反応するポリクローナル抗体（酵素標識物）を緩衝液に溶解したもの。
4) **一次抗原抗体反応**　抗ダイオキシン類抗体と抗原(ダイオキシン類)との反応。
5) **二次抗原抗体反応**　固相プレート上の擬似抗原に結合した抗ダイオキシン類抗体と二次抗体との反応。
6) **B/B_0%**　測定対象の吸光度をブランク(濃度 0)の吸光度で除し 100 倍した数値。

7) IC_{50}　50%の阻害がかかる濃度(50% Inhibition Concentration)。

8) 精度プロファイル 精度確認用の標準溶液濃度と変動係数(CV%)との関連図。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

1) 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

(1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

(2) 特に指定がない限り、(1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

(3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = Q_{DL} \times k \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、V　：測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3N)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(ng/mL, DMSO 溶液中)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：必要となる試料ガスにおける検出下限(ng-TEQ/m^3N)

(4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5ng-TEQ/m^3N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/m^3N)

抽出液を 20mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の DMSO 溶液に調製する場合の試料ガスの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 0.018ng/mL、排出ガスの測定量への換算係数は 0.422 を用いた。

$$V = 0.018 \times 0.422 \times 1 \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.09$$

(原則として、4 時間 $3m^3N$ の試料ガス採取を標準とする。)

2) ばいじん試料の採取量

ばいじん試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

(1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

(2) 特に指定がない限り、(1)で決定した濃度の 1/30 以下にばいじん試料における検出下限を設定する。

(3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん試料の量を算出する。

$$W = Q_{DL} \times k \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W　：測定に必要な最小のばいじん試料の量(g)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(ng/mL, DMSO 溶液中)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：必要となるばいじん試料における検出下限(ng-TEQ/g)

(4) 算出された最小のばいじん試料の量以上をばいじん試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 20mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の DMSO 溶液に調製する場合のばいじん試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は 0.018ng/mL、ばいじん試料の測定量への換算係数は 0.595 を用いた。

$$W = 0.018 \times 0.595 \times 1 \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.22$$

3) 燃え殻試料の採取量

燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

(1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

(2) 特に指定がない限り、(1)で決定した濃度の 1/30 以下に燃え殻試料における検出下限を設定する。

(3) 以下の式によって測定に必要な最小の燃え殻試料の量を算出する。

$$X = Q_{DL} \times k \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、X　：測定に必要な最小の燃え殻試料の量(g)

Q_{DL}　：標準物質における検出下限(ng/mL, DMSO 溶液中)

k　：測定量(毒性等量)への換算係数

v　：測定用試料の液量(mL)

V_E　：抽出液量(mL)

V'_E　：抽出液分取量(mL)

C_{DL}　：必要となる燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

(4) 算出された最小の燃え殻試料の量以上を燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) 3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる燃え殻試料における検出下限は 0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 20mL に定容し、その抽出液から 10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1mL の DMSO 溶液に調製する場合の燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は、0.018ng/mL、燃え殻試料の測定量への換算係数は 0.522 を用いた。

$$W = 0.018 \times 0.522 \times 1 \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.19$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 4-3-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

図 4-3-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1) **水**　JIS K0557 に規定する A4（又は A3）の水
2) **メタノール**　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3) **アセトン**　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4) **トルエン**　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5) **ジクロロメタン**　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6) **ヘキサン**　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
7) **デカン**　測定に支障のない品質のもの
8) **ジメチルスルホキシド (DMSO)**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの
9) **塩酸**　JIS K8180 に規定するもの、又は同等の品質のもの
10) **硫酸**　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
11) **硝酸銀**　JIS K8550 に規定するもの、又は同等の品質のもの
12) **硫酸ナトリウム**　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
13) **ヘキサン洗浄水**　1）の水を 6）のヘキサンで十分洗浄したもの
14) **シリカゲル**　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの
15) **硫酸（44%質量分率）シリカゲル**　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの
16) **硝酸銀（20%質量分率）シリカゲル**　14）のシリカゲル 100 g に対して 11)の硝酸銀で調製した硝酸銀溶液（625 g/L）40 mL を加えた後、ロータリーエバポレータで水分を完全に除去する。硝酸銀シリカ

ゲルは、調製後、密閉できる着色容器に入れ、デシケーター中に保存する。

17) アルミナ　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもので、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているもの

18) 窒素　JIS K1107 に規定する高純度窒素 1 級

19) ガラスウール　JIS K8251 に規定するもの、又は同等の品質のもの

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がフッ素樹脂製のものを用いてもよい。

3.2 高速溶媒抽出装置

ダイオネクス製 ASE-200 又はこれと同等品。ASE 用の器具一式（セルボディー、セルエンドキャップアセンブリ、溶媒ボトル、補修ボトルアセンブリ、コンプレッサー等）

3.3 濃縮器

クデルナーダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない。

3.4 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径 14mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.5 アルミナカラムクロマト管

内径 6mm、長さ 50mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.6 ヒーター

カラムクロマト管を包み込み 100℃程度まで加熱することができるもの

3.7 送液ポンプ

流速の調節が毎分 0.1 ～ 10 mL の範囲内で可能であって、流速の変動が±2%以内のもの

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 に準拠し、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 4-3-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

図 4-3-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

2) ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2) 又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 4-3-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

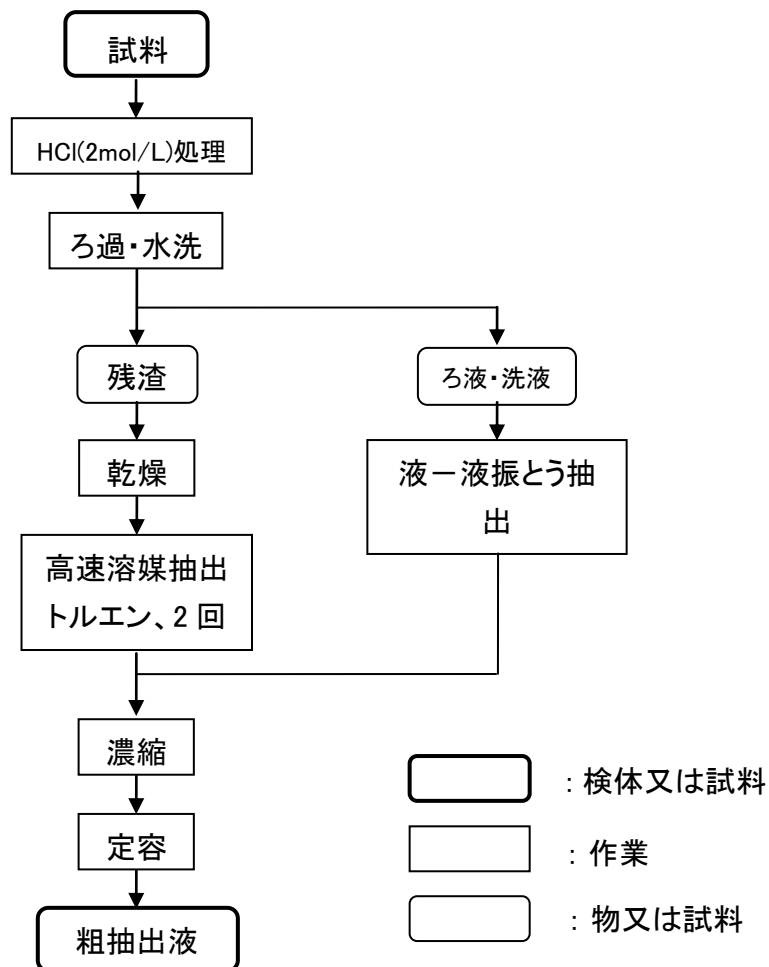



図 4-3-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

4.3 クリーンアップ

図 4-3-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

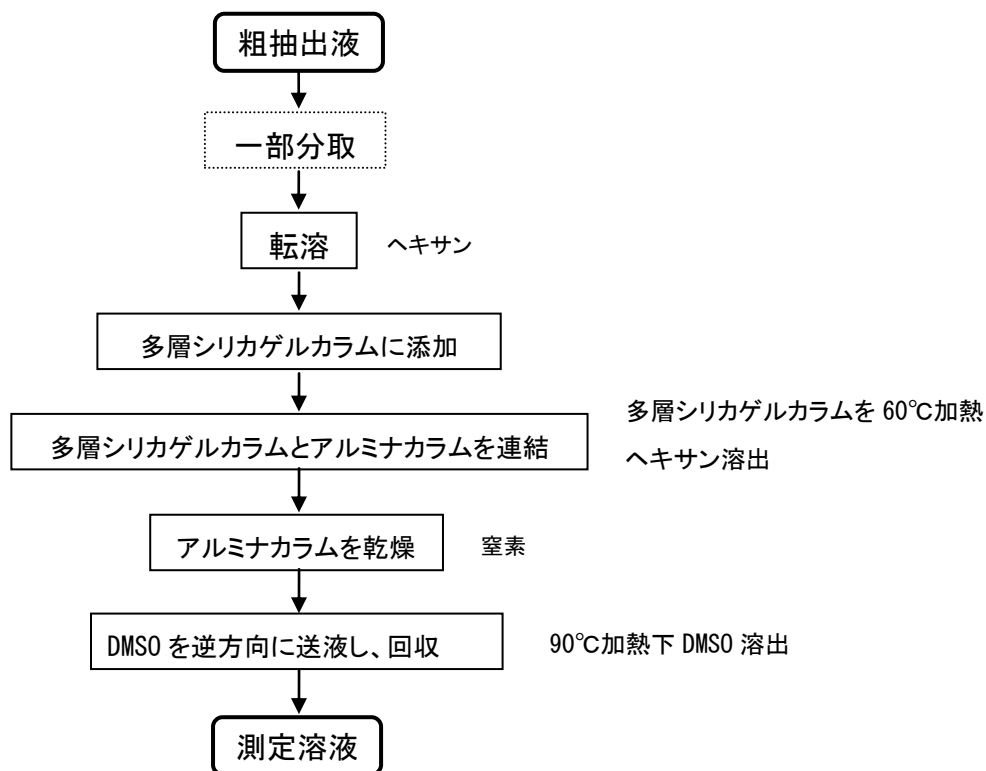



図 4-3-5　クリーンアップのフローの例

1) 抽出液の分取

(1) 抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。排出ガスについては $1.0m^3N$ 相当量、ばいじん及び燃え殻については 1.0g 相当量の抽出液を 1 回のクリーンアップの目安とする。

(2) あらかじめ、デカン 0.4 mL を入れた受器に適量の抽出液を入れ、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この濃縮液に適当量のヘキサンを加え、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この操作を 3 回程度繰り返し、トルエンを除去する。その後、次に示す多層シリカゲルカラム－アルミナカラム操作によってクリーンアップを行う。

2) 精製カラムの作製

(1) 多層シリカゲルカラム

3.3 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、シリカゲル 2.3g、硫酸（44%質量分率）シリカゲル 10.4g、シリカゲル 0.2g、硝酸銀（20%質量分率）シリカゲル 3.6g、シリカゲル 1.5g を順次充填する。このカラムを図 4-3-6 に示す。

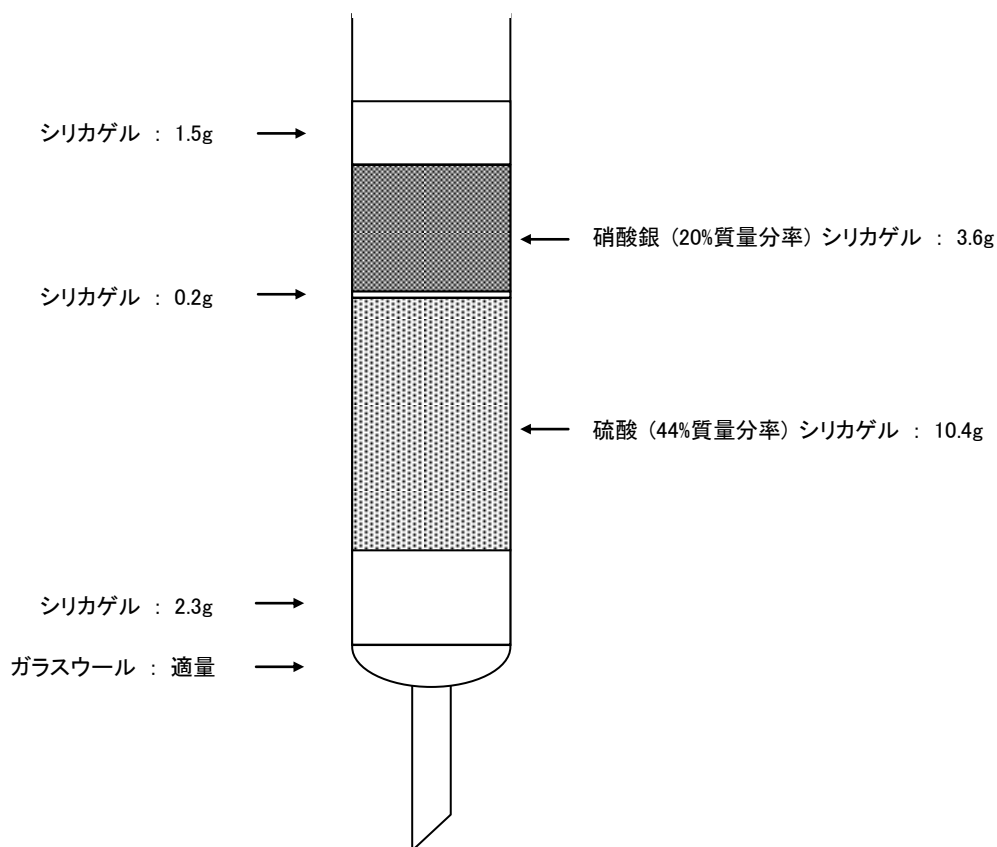



図 4-3-6　多層シリカゲルカラムの例

(2) アルミナカラム

3.4 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、アルミナ 1.0 g 程度を充填し、その上からガラスウールを詰める。このカラムを図 4-3-7 に示す。

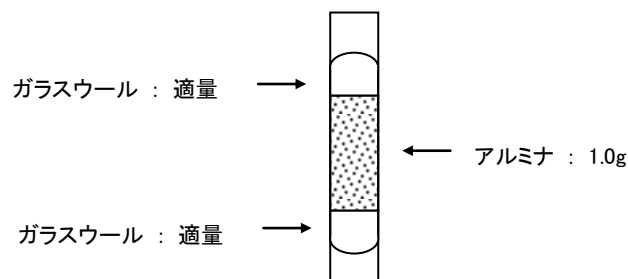



図 4-3-7　アルミナカラムの例

3) クリーンアップ操作

(1) 図 4-3-8 に示す様に、2) の(1)多層シリカゲルカラム、(2)アルミナカラムを連結し、多層シリカゲルカラムを構成する上端のシリカゲル、硝酸銀シリカゲル及び硫酸シリカゲルの上半分の部分を覆うようにヒーターをセットする。

(2) 濃縮した試料にヘキサンを加え、多層シリカゲルカラムに添加する。添加する試料の液量は容器の洗液を合わせて最大 5mL までとする。

(3) ヒーターにより 60℃で 10 分間カラムを加熱する。

(4) 60℃加熱下、ヘキサン 85 mL を送液（2.5 mL/min）する。

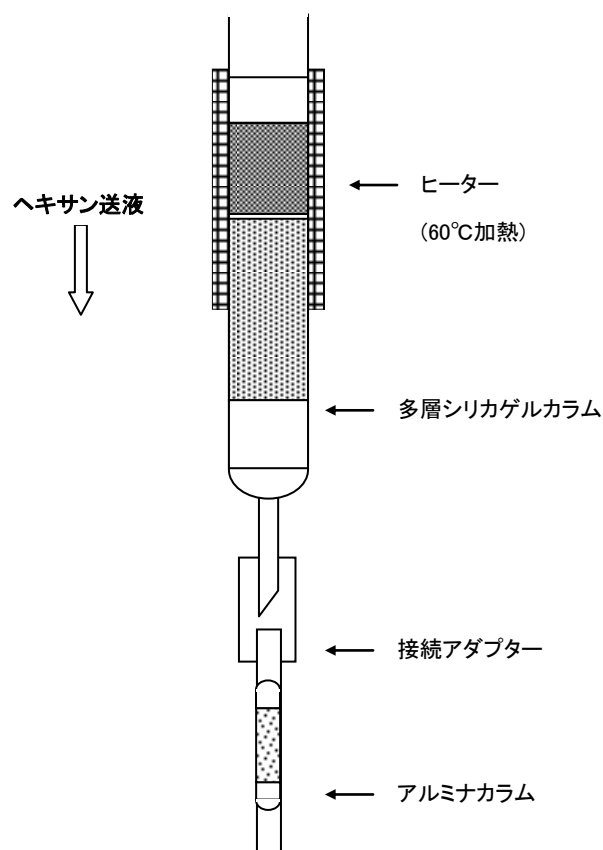



図 4-3-8　多層シリカゲルカラムとアルミナカラムの組み立て例

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 1)の(4)の操作後、アルミナカラムに窒素を通じ、ヘキサンを除去する。

(2) アルミナカラムを包み込むようにヒーターをセットし、90℃で 10 分間加熱する。

(3) 90℃加熱下、3）の(4)のヘキサンの送液方向とは逆方向に、即ちアルミナカラム下端側から DMSO 2.5mL を送液（2.5mL/min）し、上端側から溶出する DMSO 溶液約 1mL を予め秤量済みのバイアル瓶に回収する。図 4-3-9 にアルミナカラムを反転させない場合の操作例を示す。

(4) 回収後、バイアル瓶を秤量し、密栓後、室温で暗所に保存する。秤量の差分を DMSO 定容量とする。

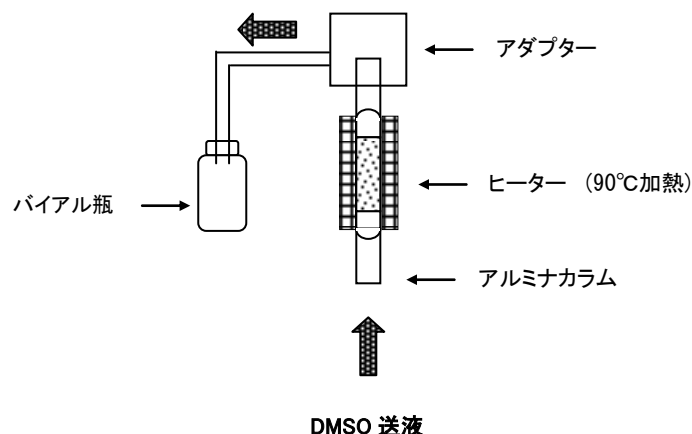



図 4-3-9　アルミナカラムを反転させない場合の DMSO への置換操作の例

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類の毒性等量との相関性の高い、五塩素化ジベンゾフラン類と特異的に反応する抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及びプレート固相抗原を用いた間接競合酵素免疫測定法によりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

6-(3,3',4'-トリクロロビフェニル-4-イロキシ)ヘキサン酸（略称77-2標準物質）を用いて検量線を作成し、試料の吸光度から算出した実測濃度に、排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を乗じることにより、測定量(毒性等量)を算出する。

２．使用キット、試薬、器具及び装置

2.1 使用キット

使用キット（抗ダイオキシン類モノクローナル抗体には、マウス由来の融合細胞（ハイブリドーマ）から収得した五塩化ジベンゾフラン類を特異的に認識する抗体を、プレート固相抗原及び検量線作成用標準品には、6-(3,3',4'-トリクロロビフェニル-4-イロキシ)ヘキサン酸を使用する。）は、以下の試薬等から構成されるものである。

1) **ダイオキシン抗原固相化マイクロプレート** 96well 1 枚
2) **希釈液(0.0375% Triton X-100，0.05% スラオフ 72N)** 7mL
3) **一次抗体粉末** 3.5mL 用 2 本
4) **標識二次抗体粉末** 7mL 用 2 本
5) **粉末抗体溶解液(0.4% ブロックエース(カゼイン系ブロッキング剤)，0.05% スラオフ 72N)** 24mL
6) **6 倍濃縮洗浄液** 50mL
7) **発色液(0.05%以下 テトラメチルベンジジン，0.01%以下 過酸化水素，0.5%以下 pH 緩衝剤，1%以下 安定化剤等)** 15mL
8) **発色停止液(約 2%(0.2M)硫酸，その他 0.1%以下)** 15mL

9)　プレートシール 1 枚

10)　使用説明書 1 部

2.2 試薬

測定に用いる使用キット以外の試薬は、次による。

1) 水 JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水又は同等の品質のもの

2) ジメチルスルホキシド(DMSO) JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの(注 1)

3) 標準物質(6-(3,3',4'-トリクロロビフェニル-4-イロキシ)ヘキサン酸)(77-2 標準物質)

(注 1) ジメチルスルホキシド(DMSO)の品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

1)　プレートリーダー 分光光度計　測定波長 450 nm、温度制御機能は不要

2)　ディスポーザブル培養試験管 96well タイプのガラス製希釈容器で代用可

3)　試験管ミキサー

4)　冷蔵庫

5)　マイクロピペット 1～20μL

6)　マイクロピペット 20～200μL

7)　マイクロピペット 200～1000μL

8)　マルチチャンネルピペット 8 チャンネル 5～50μL

9)　マルチチャンネルピペット 8 チャンネル 50～300μL

10)　ピペットチップ

11)　ピペッティングリザーバー

12)　マイクロチューブ用ラック マルチチャンネルピペットに対応したもの

13)　ストップウォッチ

14)　ストリップイジェクター

15)　ペーパータオル

3．キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守すること。

1) キットは、冷蔵庫(2～8℃)にて保管すること。

2) キットは、使用前に 30 分程度放置して室温に戻してから使用すること。

3) 異なるキットの試薬を組み合わせて使用しないこと。

4) キットを分割使用する場合、粉末抗体を溶解後、冷蔵保存で 2 週間を過ぎたものは使用しないこと。

5) キットの有効期間は、未開封の状態で製造より 1 年間で、有効期間の過ぎたものは使用しないこと。

6) キットを保管する場合は、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度の情報を記録し、保存すること。

４．測定操作

4.1 予備実験

本測定では、IC_{50}付近の吸光度となる値を定量値として採用するため、予備実験によりIC_{50}となる希釈倍率を推定したのちに本実験を行うことが望ましい。予備実験は次のような手順によって行う。予備実験例を図 4-3-10 に示す。

1) 試料を DMSO 溶液で 10 倍、100 倍に希釈する。

2) 4.4 以降の手順で n=1 で測定を行い、B/B_0%を算出する。

3) 結果を片対数グラフにプロットし、IC_{50}となる希釈倍率を読み取る。読み取った希釈倍率となるように試料を DMSO 溶液で希釈し、本実験用試料とする。

希釈倍率	吸光度	B/B_0%
ブランク	1.250	100
×1	0.129	10.3
×10	0.543	43.4
×100	0.975	78

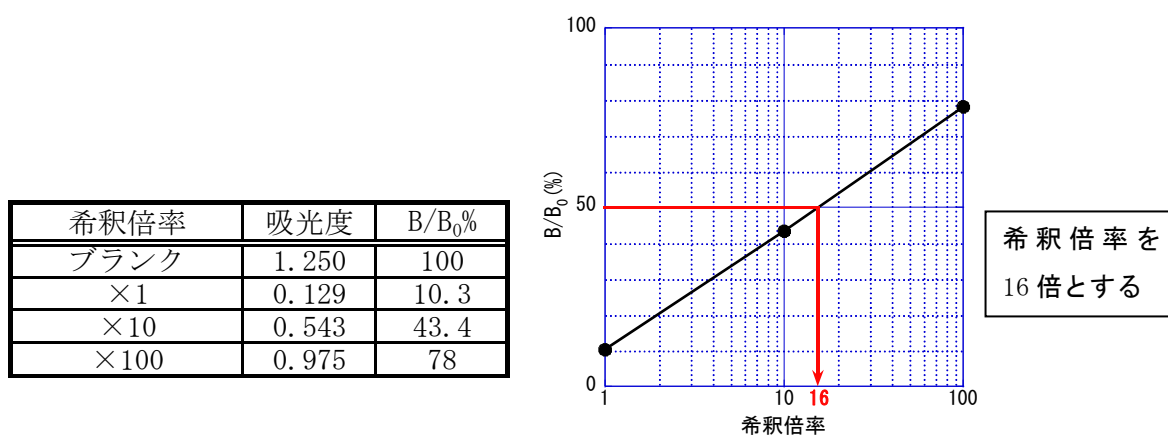



図 4-3-10　予備実験例

4.2 標準溶液の調製

DMSO 溶液を用いて標準物質を希釈し、20、5、1、0.3、0.1ng/mL 濃度になるようにそれぞれ培養試験管に調製する。

4.3 試料希釈溶液の調製

各試料に対して設定した希釈倍率の希釈溶液を培養試験管に調製する。

4.4 一次抗体液の調製

一次抗体粉末に粉末抗体溶解液（24mL）のうちの 3.5mL を加えて溶解する。

4.5 一次抗原抗体反応

ダイオキシン抗原固相化マイクロプレートの各 well に、希釈液 40µL/well を添加し、次に 2)及び 3)で調製した標準溶液、試料希釈溶液及び濃度 0 ブランク（100%DMSO 溶液）を 10µL/well 添加し、20%DMSO 溶液を作製する。その後、4)で調製した一次抗体液 50µL/well を添加し、液面が水平になるように端を軽く叩く（注 2）。プレートシールを貼り、室温（18～25℃）で 90 分間反応させる（注 3）。

n＝3 で測定する場合の、各試料溶液のマイクロプレートへの分注（配置）例を図 4-3-11 に示す。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	試料 3-1	試料 3-2	試料 3-3	試料 11-1	試料 11-2	試料 11-3	試料 19-1	試料 19-2	試料 19-3
B	STD 5	STD 5	STD 5	試料 4-1	試料 4-2	試料 4-3	試料 12-1	試料 12-2	試料 12-3	試料 20-1	試料 20-2	試料 20-3
C	STD 4	STD 4	STD 4	試料 5-1	試料 5-2	試料 5-3	試料 13-1	試料 13-2	試料 13-3	試料 21-1	試料 21-2	試料 21-3
D	STD 3	STD 3	STD 3	試料 6-1	試料 6-2	試料 6-3	試料 14-1	試料 14-2	試料 14-3	試料 22-1	試料 22-2	試料 22-3
E	STD 2	STD 2	STD 2	試料 7-1	試料 7-2	試料 7-3	試料 15-1	試料 15-2	試料 15-3	試料 23-1	試料 23-2	試料 23-3
F	STD 1	STD 1	STD 1	試料 8-1	試料 8-2	試料 8-3	試料 16-1	試料 16-2	試料 16-3	試料 24-1	試料 24-2	試料 24-3
G	試料 1-1	試料 1-2	試料 1-3	試料 9-1	試料 9-2	試料 9-3	試料 17-1	試料 17-2	試料 17-3	試料 25-1	試料 25-2	試料 25-3
H	試料 2-1	試料 2-2	試料 2-3	試料 10-1	試料 10-2	試料 10-3	試料 18-1	試料 18-2	試料 18-3	試料 26-1	試料 26-2	試料 26-3

図 4-3-11　96well マイクロプレート上での試料の配置例

(注 2)泡立ちやすいため、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作すること。

(注 3)反応中はマイクロプレートを静置すること。

4.6 洗浄液の調製及び未反応物の除去

一次抗原抗体反応時間中に、6 倍濃縮洗浄液と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、洗浄液を調製する。一次抗原抗体反応終了後、反応液を廃棄する。洗浄液 300µL /well 入れて廃棄する操作を 3 回繰り返し、各ウェルを洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上でダイオキシン抗原固相化マイクロプレートをタッピングし、洗浄液を完全に除去する。

4.7 標識二次抗体液の調製

標識二次抗体粉末に、粉末抗体溶解液（24mL）のうちの 7mL を加えて溶解する。

4.8 二次抗原抗体反応

洗浄したダイオキシン抗原固相化マイクロプレートに 7)で調製した標識二次抗体液 100µL /well を添加し、液面が水平になるように端を軽く叩く。プレートシールを再び表面に貼り、室温（18～25℃）で 60 分間反応させる。

4.9 未反応物の除去

二次抗原抗体反応終了後、反応液を廃棄する。6)で調製した洗浄液 300µL/well 入れて廃棄する操作を 3 回繰り返し、各ウェルを洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上でダイオキシン抗原固相化マイクロプレートをタッピングし、洗浄液を完全に除去する。

4.10 発色反応

洗浄したダイオキシン抗原固相化マイクロプレートに発色液を 100µL/well 添加し､液面が水平になるように端を軽く叩く。プレートシールを再び表面に貼り、室温（18～25℃）で 30 分間反応させた後、発色停止液を 100µL/well 添加する。

4.11 吸光度測定

ダイオキシン抗原固相マイクロプレート外側の底面に付着した汚れや水分を、柔らかなペーパータオル等できれいに拭き取った後、波長 450nm における吸光度をプレートリーダーで測定する(注 4)。

(注4) 吸光度測定は反応停止後、速やかに行うこと(15分以内が望ましい)。

4.12 測定操作時の留意事項

1) 一次抗原抗体反応、二次抗原抗体反応、発色反応の反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。

2) ダイオキシン抗原固相化マイクロプレートへの分注操作は素早く行うこと。

3) ダイオキシン抗原固相マイクロプレートの洗浄後は、次の試薬を分注する前に、残液が極力少なくなるようにタッピングを行い、残液を除去すること。

4) 発色反応の際に異常発色が認められる場合は、二次抗体による非特異反応が考えられる。ダイオキシン抗原固相マイクロプレートの洗浄回数を再検討し、ウェル内の二次抗体が十分除去できる洗浄条件に設定すること。

5) 発色停止液を分注した後は、15 分以内に吸光度を測定することが望ましい。

5．定量

5.1 検量線の作成

標準物質の濃度に対して吸光度をプロットし、検量線を作成する。

1)　標準物質

6-(3,3',4'-トリクロロビフェニル-4-イロキシ)ヘキサン酸(77-2 標準物質)

2)　標準溶液の調製

表 4-3-1 に検量線作成用標準液の調製例を示す。77-2 標準溶液を DMSO で順次希釈していき、表 4-3-1 に示す濃度の STD1～STD5 を調製する。なお、77-2 標準物質を含まない 100%DMSO 溶液をブランクとする。

表 4-3-1　検量線作成用標準溶液の調製例

単位	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	ブランク
pg/well	200	50	10	3	1	0
ng/ml	20	5	1	0.3	0.1	0

3)　検量線の作成

各濃度に調製した 77-2 標準溶液のキット測定を行い、プレートリーダーにより波長 450nm における吸光度を測定する。77-2 標準物質設定濃度及び吸光度から、下記に示す 4-パラメーターの式の各係数（A～D）を算出（4-パラメーター・ソフトウェアを用いてもよい）する。表 4-3-2 及び図 4-3-12 に検量線の作成例を、表 4-3-3 にパラメーターの式の各係数例を示す。

$$y = \frac{(A-D)}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^{B}} + D$$

ここに、x ： 実測濃度(ng/mL)

y ： 吸光度

A ： 濃度0でのB/B_0%

B ： IC_{50}での傾き

C ： IC_{50} (ng/mL)

D ： 過剰濃度でのB/B₀%

表 4-3-2　検量線の作成例

77-2標準物質濃度 ng/ml		B/B0 %
ブランク	0	100
STD5	0.1	89.6
STD4	0.3	74.5
STD3	1	44.3
STD2	5	15.4
STD1	20	7.2

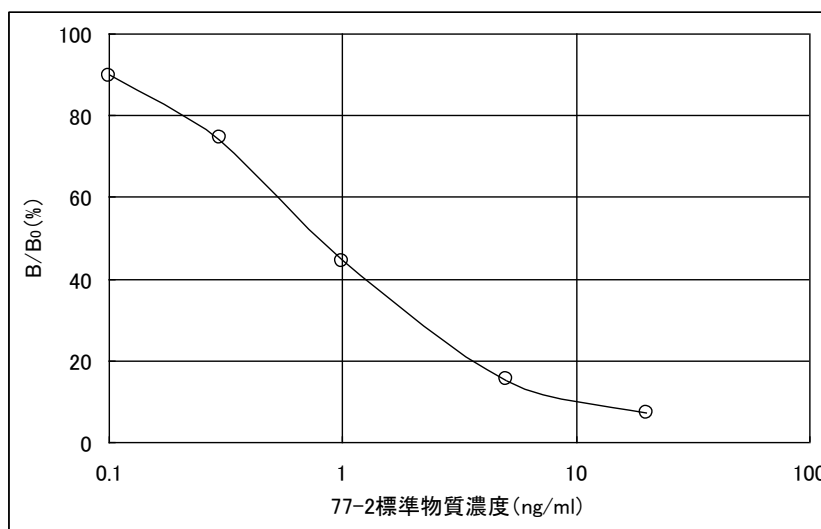



図 4-3-12　検量線の作成例

表 4-3-3　4-パラメーターの式の各係数例

4-パラメーター式の各係数		
A	濃度0でのB/B_0%	99.83
B	IC_{50}での傾き	1.088
C	IC_{50}(ng/ml)	0.740
D	過剰濃度でのB/B_0%	4.702

5.2 検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

検量線作成用標準溶液の測定操作により得られたデータから測定量(毒性等量)を求め、管理図に記録し保存する。以下に、ばいじんの例を示す。

1) 検量線における IC_{50}(B/B_0 で 50%)付近の吸光度から、4-パラメーターの式を用いて標準物質濃度を算出する。表 4-3-2 の例では、STD3 における測定値の B/B_0 がおよそ 50%に相当する。

2) 標準物質濃度に希釈倍率を乗じた数値を換算式に代入し、測定量(ng-TEQ/mL)を算出する（表 4-3-4 参照)。

3) 得られた測定量(ng-TEQ/mL)を平均し、管理図に記録し保存する。

4) IC_{50} 付近における測定量の工程平均(μ)と標準偏差(σ)を算出し、±2σ を管理限界とする。この際の変動係数(CV%)は、20%以内に収まることが望ましい。管理限界等の数値例及び作成した管理図の例をそれぞれ表 4-3-4 及び図 4-3-13 に示す。

5) １点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うと共に、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について、記録をする。

表 4-3-4　管理図用データ導出例

77-2標準物質濃度 ng/ml	n=1				n=2			
	測定値（吸光度）	B/B_0 %	標準物質濃度 ng/ml	TEQ ng-TEQ/ml	測定値（吸光度）	B/B_0 %	標準物質濃度 ng/ml	TEQ ng-TEQ/ml
ブランク	1.428	100			1.564	100		
STD5	1.333	93.4			1.425	91.1		
STD4	1.078	75.5			1.235	79.0		
STD3	0.668	46.8	→1.02	→0.61	0.834	53.3	→1.00	→0.60
STD2	0.254	17.8			0.322	20.6		
STD1	0.113	7.9			0.122	7.8		

表 4-3-5　管理図用データ算出例

工程平均	μ	0.60
測定値の標準偏差	σ	0.0193
測定値の変動係数	C.V.	3.19
管理限界	μ ±2σ	0.56～0.64

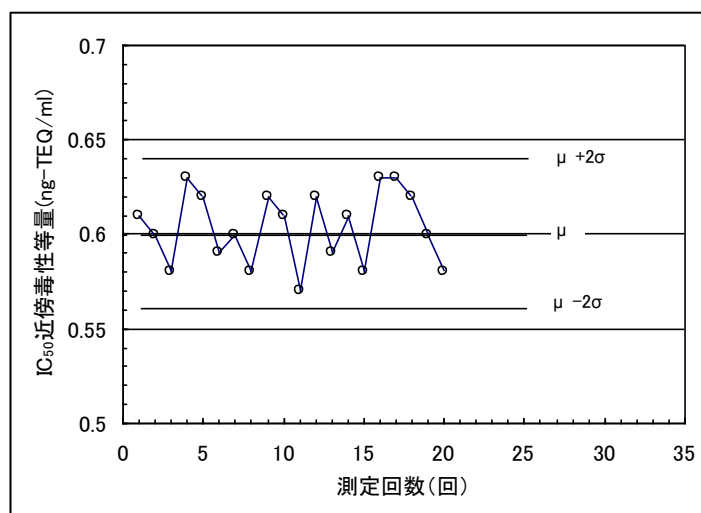



図 4-3-13　管理図の例

5.3 測定試料の定量

各試料の吸光度を検量線に内挿し、阻害率(B/B_0) 20～80%の範囲でかつ希釈直線性が認められる範囲の濃度に各希釈倍率を掛けた値の平均値（濃度の平均値）を用いて、次式により実測濃度(排出ガスにおいては ng/m^3N、ばいじん及び燃え殻においては ng/g)を算出する。

$$C_S = X \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、C_S　：　実測濃度(ng/m³N 又は ng/g)

X　：　濃度の平均値(ng/mL)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

v　：　測定用試料の液量(mL)

V　：　試料採取量(m³N 又は g)

（備考）排出ガスの酸素濃度による補正がは、次式による。

$$C = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、C　：　酸素の濃度 On における実測濃度(ng/m³N)

O_S　：　排出ガス中の酸素の濃度(%)（注 5）

C_S　：　排出ガス中の実測濃度(ng/m³N)

（注 5）排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、Os=20 とする。

６．検出下限及び定量範囲

6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲の確認(各媒体共通)

標準物質における検出下限及び定量範囲の確認は、定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限とし、20%以下となる上下 2 点間を定量範囲とする方法で行う。下記に n=6 で測定した例を示す。

1) 検出下限等算出用標準溶液の調製例

(1) 100ng/mL の標準溶液(STD1)を DMSO で 4 倍に希釈し、STD2 を調製する。

(2) STD2 から一定量を分取し、DMSO で 4 倍に希釈して STD3 を調製する。

(3) 以下、同様の手順で順次 4 倍希釈液(STD4～STD7)を調製し、検出下限等算出用標準溶液として標準溶液の 7 段希釈系列を調製する(表 4-3-6 参照)。

表 4-3-6　検出下限等算出用標準溶液

単位	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	ブランク
ng/ml	100	25	6.25	1.56	0.391	0.0977	0.0244	0

2) 検出下限及び定量範囲の算出例

(1) 調製した検出下限等算出用標準溶液を 2.5 測定操作に従って測定する。n=6 の 7 段希釈系列で測定する場合のマイクロプレートへの分注操作の一例を図 4-3-14 に示す。

(2) 吸光度（測定値）を測定して、4-パラメーターの式の各係数(A～D)を算出し、吸光度から検出下限等算出用標準溶液相当量(定量値)を算出する。

(3) 各希釈濃度域における定量値の平均値、標準偏差(σ)及び変動係数(CV%)を算出する(表 4-3-7 参照)。

(4) 横軸に検出下限等算出用標準液濃度、縦軸に変動係数をプロットした精度プロファイルを作成する(表 4-3-15 参照)。

(5) 精度プロファイルより、変動係数 30%の点を検出下限、20%となる上下 2 点間を読み取り、定量範囲とする。変動係数の検出下限、定量下限の確定方法は、第３節　測定データの精度管理　５．生物

検定法における定量結果の確定と結果の報告　5.1　検出下限及び定量範囲に示すとおりである。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO						
B	STD 7-1	STD 7-2	STD 7-3	STD 7-4	STD 7-5	STD 7-6						
C	STD 6-1	STD 6-2	STD 6-3	STD 6-4	STD 6-5	STD 6-6						
D	STD 5-1	STD 5-2	STD 5-3	STD 5-4	STD 5-5	STD 5-6						
E	STD 4-1	STD 4-2	STD 4-3	STD 4-4	STD 4-5	STD 4-6						
F	STD 3-1	STD 3-2	STD 3-3	STD 3-4	STD 3-5	STD 3-6						
G	STD 2-1	STD 2-2	STD 2-3	STD 2-4	STD 2-5	STD 2-6						
H	STD 1-1	STD 1-2	STD 1-3	STD 1-4	STD 1-5	STD 1-6						

図 4-3-14　96 ウェルマイクロプレート上での検出下限等算出用標準溶液の配置例

表 4-3-7　変動係数の算出例

STD	標準液濃度 ng/ml	測定結果(ng/ml)							σ	CV %
		1	2	3	4	5	6	平均		
ブランク	0	0.026	(−)	(−)	0.011	(−)	(−)	0.018	0.011	56.7
STD7	0.0244	0.033	(−)	0.036	0.049	0.051	0.058	0.045	0.011	23.3
STD6	0.0977	0.103	0.103	0.116	0.129	0.122	0.128	0.117	0.012	10.0
STD5	0.391	0.401	0.365	0.399	0.398	0.387	0.375	0.388	0.015	3.8
STD4	1.56	1.456	1.406	1.530	1.553	1.446	1.503	1.482	0.056	3.8
STD3	6.25	7.696	6.747	6.889	7.975	6.544	6.889	7.123	0.573	8.0
STD2	25	36.789	25.545	13.665	44.156	24.610	30.136	29.150	10.563	36.2
STD1	100	33.126	(+)	(+)	31.559	(+)	(+)	32.343	1.108	3.4

(備考)表中の(-)及び(+)は測定結果が得られなかったことを示す。

CV は測定結果が得られたものについて算出した。

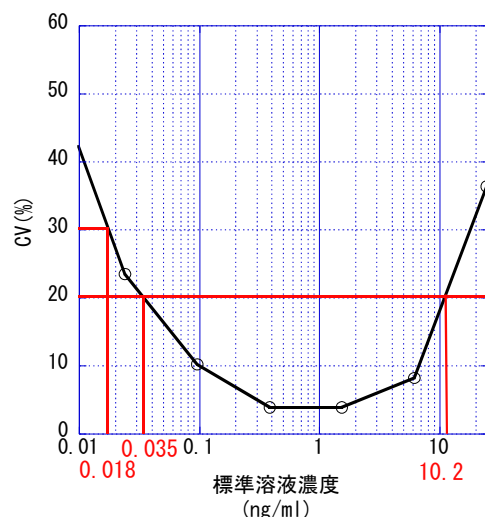



図 4-3-15　精度プロファイルの例

上記方法により算出したキットの検出下限及び定量範囲を表 4-3-8 に示す。なお、本法により算出した検出下限及び定量範囲は、100%DMSO 溶液中の標準物質相当量(ng/mL)である。

また、1 ウェル当たりの試料分注量は 10μL であり、測定媒体に関わらず同じである。

表 4-3-8　標準物質における検出下限及び定量範囲

検出下限		定量範囲	
pg/well	ng/ml	pg/well	ng/ml
0.18	0.018	0.35～100	0.035～10

6.2 試料における検出下限及び定量範囲の確認

前処理に供した試料量と前処理を経た最終検液量等から、標準物質における検出下限及び定量下限を用いて理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量等により異なるため、表 4-3-9 及び表 4-3-10 に例を示す。

表 4-3-9　試料における検出下限

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	検出下限	分注量	試料量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍率	実測濃度
	pg/well	μl/well	m^3N又はg(注6)	%	ml/ml	ml	−	ng/m^3N又はng/g(注7)
排出ガス	0.18	10	1.5	12.0	10/20	1.0	1	0.024
ばいじん			1.00	−	10/20	1.0	1	0.036
燃え殻			1.00	−	10/20	1.0	1	0.036

表 4-3-10　試料における定量範囲（注 8）

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	定量範囲値	分注量	試料量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終検液量	希釈倍率	実測濃度
	pg/well	μl/well	m^3N又はg(注6)	%	ml/ml	ml	-	ng/m^3N又はng/g(注7)
排出ガス	0.35～100	10	1.5	12.0	10/20	1.0	1	0.05～13.3
ばいじん			1.00	-	10/20	1.0	1	0.07～20
燃え殻			1.00	-	10/20	1.0	1	0.07～20

(注 6) 排出ガスにおいては m^3N、ばいじん及び燃え殻においては g とする。

(注 7) 排出ガスにおいては ng/m^3N、ばいじん及び燃え殻においては ng/g とする。

(注 8) 本例では、定量下限及び定量上限の両方を算出した。

7．測定量(毒性等量)への換算

測定量(毒性等量)は下記の換算式を用いて実測濃度から算出し、結果を記録する。また、使用した換算式も含め、測定量の算出に至った計算過程を説明できる資料を作成する。

1) 排出ガス

希釈系列 1mL 当たりの実測濃度(ng/mL)×希釈倍率（以下「Q」と表記)から換算式を用いて測定量(毒性等量、排出ガス総抽出液当たり)への換算を行う。

$$測定量(毒性等量)(ng\text{-}TEQ/m^3N) = Q \times 0.422 \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、 Q ： 希釈倍率に実測濃度を乗じたもの(ng/mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

v ： 測定用試料の液量(mL)

V ： 試料採取量(m^3N)

2) ばいじん

希釈系列 1mL 当たりの実測濃度(ng/mL)×希釈倍率(以下「Q」と表記)から換算式を用いて測定量(毒性等量、ばいじん総抽出液当たり)への換算を行う。

$$測定量(毒性等量)(ng\text{-}TEQ/g) = Q \times 0.595 \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、 Q ： 希釈倍率に実測濃度を乗じたもの(ng/mL)

V_E ： 抽出液量(mL)

V'_E ： 抽出液分取量(mL)

v ： 測定用試料の液量(mL)

V ： 試料採取量(g)

3) 燃え殻

希釈系列 1mL 当たりの実測濃度(ng/mL)×希釈倍率(以下「Q」と表記)から換算式を用いて測定量(毒性等量、燃え殻総抽出液当たり)への換算を行う。

$$測定量(毒性等量)(ng\text{-}TEQ/g) = Q \times 0.522 \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、　Q　：　希釈倍率に実測濃度を乗じたもの(ng/mL)

V_E　：　抽出液量(mL)

V'_E　：　抽出液分取量(mL)

v　：　測定用試料の液量(mL)

V　：　試料採取量(g)

なお、測定結果の報告様式については、第 2 章第 2 節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第 6 節記載の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 2.5 の 1)～11)及び 2.6 の 5)に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、2.5 の 1)～11)及び 2.6 の 5)に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

濃度既知の排出ガス試料を本測定方法により測定し得られた実測濃度(ng/mL)と、HRGC/HRMS法により測定し得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/mL)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した（図4-3-16参照）。

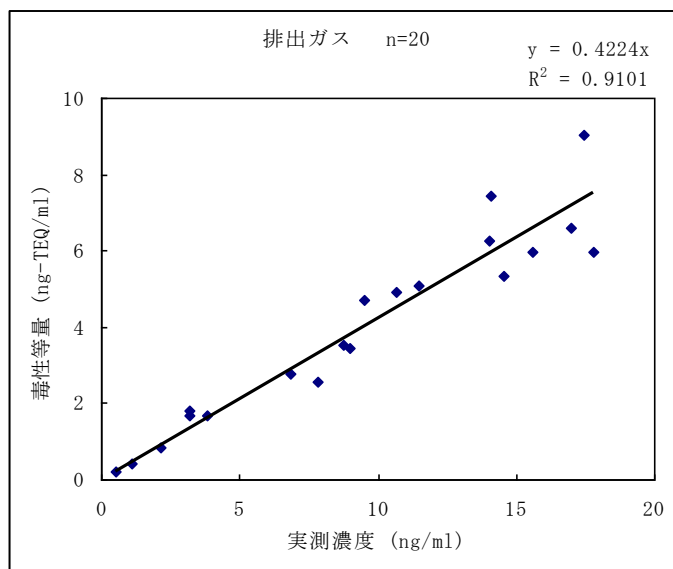



図 4-3-16　換算係数算出例（排出ガス）

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん試料)」

濃度既知のばいじん試料を本測定方法により測定し得られた実測濃度(ng/mL)と、HRGC/HRMS法により測定し得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/mL)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した（図4-3-17参照）。

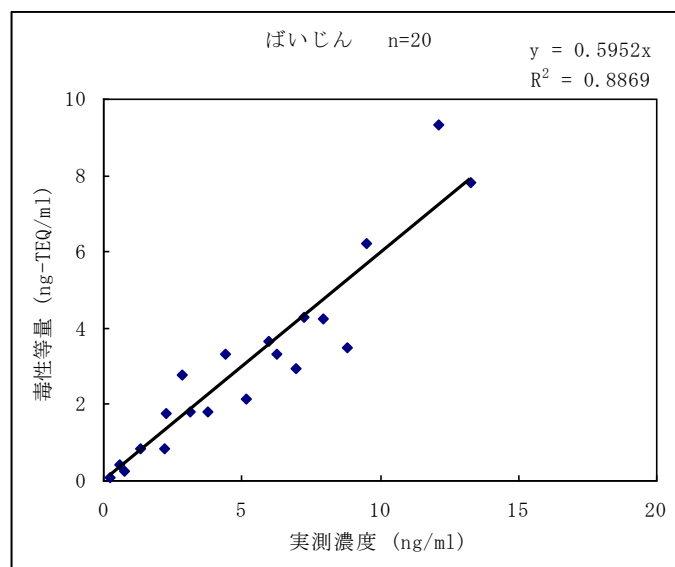



図 4-3-17　換算係数算出例（ばいじん）

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(燃え殻試料)」

濃度既知の燃え殻試料を本測定方法により測定し得られた実測濃度(ng/mL)と、HRGC/HRMS法により測定し得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/mL)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した（図4-3-18参照）。

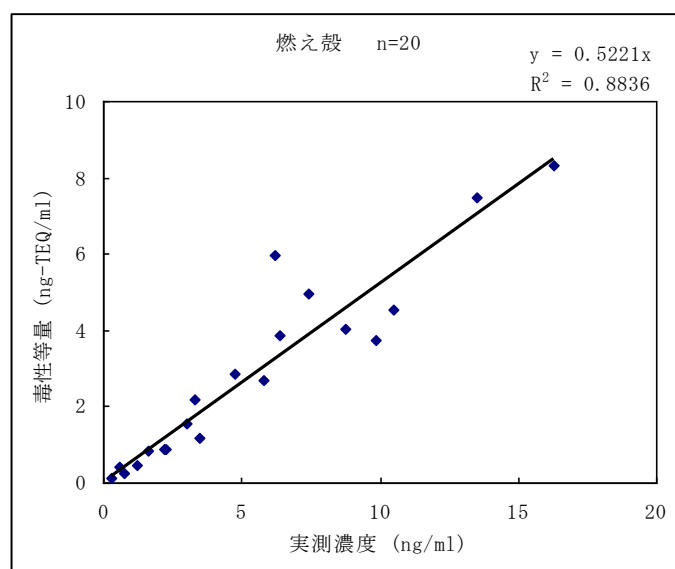



図 4-3-18　換算係数算出例（燃え殻）

その４　前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法(平成 17 年環境省告示第 92 号第 2 の 4)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体毎に試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた結合平衡除外法による測定により定量する。測定フローを図 4-4-1 に示す。

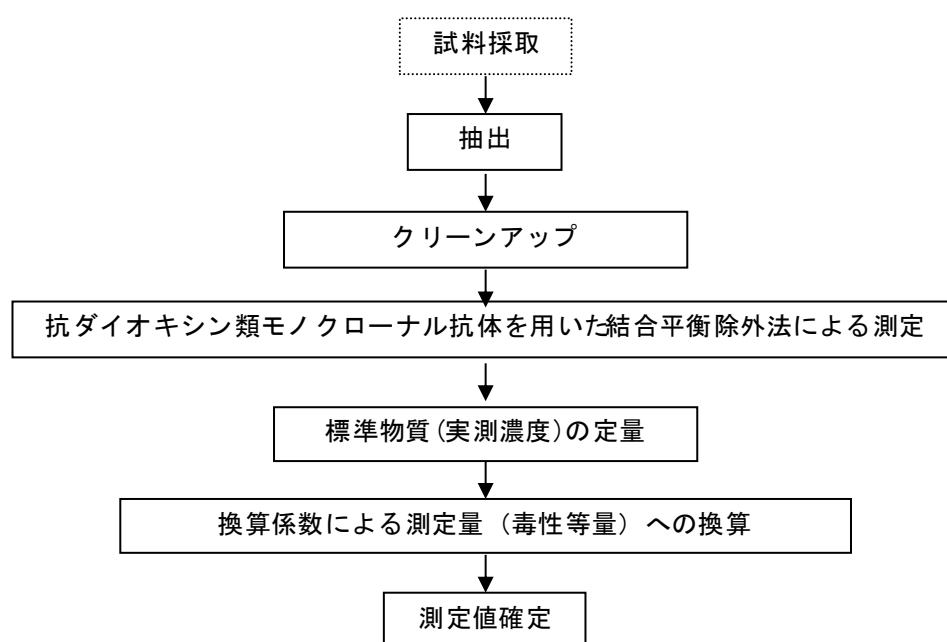



図 4-4-1　測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

1) **抗ダイオキシンモノクローナル抗体**　免疫反応によって脊椎動物に産生される抗体(タンパク質)を、マウス由来の融合細胞（ハイブリドーマ)を用いて取得したもので、ダイオキシン類と特異的に反応する性質を有する。
2) **結合平衡除外法**　レセプター分子（抗ダイオキシンモノクローナル抗体）とリガンド(ダイオキシン類)との相互作用を短時間で評価するフロー式免疫測定法であり、ホモジニアス系（均一系）であるが B/F 分離を行ったと同様な状態を構成できる高感度な測定系。
3) **フロー式免疫測定法**　ダイオキシン類と抗ダイオキシンモノクローナル抗体複合体形成時の平衡状態への干渉を抑え、複合体形成に消費されない未反応抗体トレーサーを、抗体との親和性を制御したリガンドを固相化した測定セルに通液し、固相上に捕捉された抗体トレーサー量よりダイオキシン類濃度を算出する方法。
4) **生体分子間相互作用**　液相における生体分子間の結合力（アフィニティ）に関して、極めて強い、若しくは極めて弱い結合力、又は、極めて早い、若しくは極めて遅い結合・解離反応などの生物学的相

互作用のこと。

5) **測定セル**　未反応抗体トレーサーを捕捉する目的で、親和性を制御したリガンドを固相化した高分子担体を充填した光透過性ユニットのこと。

6) **再生液**　抗体－リガンド複合体から抗体を解離させるアルカリ性の緩衝液。

7) **キャリーオーバー洗浄液**　高濃度ダイオキシン類試料を測定した際に配管へのダイオキシン類の吸着が懸念されるが、これを洗浄除去する目的で使用する 50%DMSO 水溶液のこと。

8) **校正試料補正**　本法は 1 つの測定セル上で抗体の結合、解離を反復して行い、結合した抗体量を蛍光量として連続して求めるという方法をとることから、反復測定によるセル表面の経時変化、及び測定セル間誤差を補正する必要がある。そのため各試料の測定した実測値について、TCPHA 校正液の実測値と TCPHA 標準溶液検量線との値の乖離を補正することをいう。

9) **スクリーニング測定**　前処理を行った環境試料中に含まれるダイオキシン類の濃度範囲を推定し、定量範囲での測定をするための希釈評価測定用最適供試量を求める測定。

10) **希釈評価測定**　スクリーニング測定により得られた実測値が測定系の定量下限値以上である場合、設定された最適供試量をもとに 3 段階以上の希釈系列の試料を測定し、ダイオキシン類濃度を算出する測定。

11) **低濃度評価測定**　スクリーニング測定により得られた実測値が測定系の定量下限値未満である場合、スクリーニング測定での希釈倍率を、排出ガスは 4 倍と 8 倍、ばいじん及び燃え殻は 2 倍と 4 倍に下げて 2 段階を測定し、定量範囲内の値をもとにダイオキシン類濃度を算出する測定。

12) **定量測定**　ダイオキシン類濃度を最も精度高く測定するために、TCPHA 校正液濃度と同濃度になるように希釈評価測定により算出した測定試料量を測定し、ダイオキシン類濃度を算出する測定 。

13) **IC50**　使用した抗体量の 50%反応値。50%の阻害がかかる濃度（50% Inhibition Concentration）

14) **B/B_0**　測定対象の蛍光量をブランク（濃度０）の蛍光量で除した数値。

第３節 試料採取方法に関する特記事項

１．試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況等を十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times n \times v}{k} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V ：測定に必要な最小の試料ガスの量（m^3N）

Q_{DL} ：標準物質における検出下限（μg/mL, 測定試料溶液中）

n ：希釈倍率(測定試料溶液中の測定用試料量の割合)

k ：測定量（毒性等量）への換算係数

v ：測定用試料の液量（mL）

V_E　：抽出液量（mL）

V'_E　：抽出液分取量（mL）

C_{DL}　：必要となる試料ガスにおける検出下限（ng-TEQ/m³N）

4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）5ng-TEQ / m³N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は0.17ng-TEQ/m³N)

抽出液を20mL に定容し、その抽出液から10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に0.9mLの測定用試料溶液に調製する場合の試料ガス採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は0.0022μg/mL、希釈倍率は20倍、排出ガスの測定量への換算係数は1.49μg/ng-TEQを用いた。

$$V = \frac{0.0022 \times 20 \times 0.9}{1.49} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.31$$

2．ばいじんの採取量

ばいじんの採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30 以下にばいじんにおける検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじんの量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times n \times v}{k} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、W　：測定に必要な最小のばいじんの量（g）

Q_{DL}　：標準物質における検出下限（μg/mL, 測定試料溶液中）

n　：希釈倍率(測定試料溶液中の測定用試料量)

k　：測定量（毒性等量）への換算係数

v　：測定用試料の液量（mL）

V_E　：抽出液量（mL）

V'_E　：抽出液分取量（mL）

C_{DL}　：必要となるばいじんにおける検出下限（ng-TEQ / g）

4) 算出された最小のばいじんの量以上をばいじんの採取量とする。

ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん試料における検出下限は0.1ng-TEQ/g)

抽出液を20mL に定容し、その抽出液から10mLを分取してクリーンアップを行い、最終的に0.9mLの測定用試料溶液に調製する場合のばいじんの採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は、0.0022μg/mL、希釈倍率は20倍、ばいじん試料の測定量への換算係数は、1.22μg/ng-TEQを用いた。

$$W = \frac{0.0022 \times 20 \times 0.9}{1.22} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.65$$

３．燃え殻の採取量

燃え殻の採取量は、次のような手順によって決定する。

1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。

2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30 以下に燃え殻における検出下限を設定する。

3) 以下の式によって測定に必要な最小の燃え殻の量を算出する。

$$W=\frac{Q_{DL}\times n\times v}{k}\times\frac{V_E}{V'_E}\times\frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W ：測定に必要な最小の燃え殻の量（g）

Q_{DL} ：標準物質における検出下限（μg/mL、DMSO 溶液中）

n ：希釈倍率(測定試料溶液中の測定用試料量)

k ：測定量（毒性等量）への換算係数

v ：測定用試料の液量（mL）

V_E ：抽出液量（mL）

V'_E ：抽出液分取量(mL)

C_{DL} ：必要と燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4) 算出された最小の燃え殻の量以上を燃え殻の採取量とする。

ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

（例）3ng-TEQ / g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる燃え殻試料における検出下限は0.1ng-TEQ / g)

抽出液を10mL に定容し、その抽出液から10mL を分取してクリーンアップを行い、最終的に1 mL の測定用試料溶液に調製する場合の燃え殻試料の採取量を以下に示す。なお、標準物質における検出下限は0.0022μg/mL、希釈倍率は20倍、燃え殻試料の測定量への換算係数は1.27μg/ng-TEQを用いた。

$$W=\frac{0.0022\times 20\times 0.9}{1.27}\times\frac{20}{10}\times\frac{1}{0.1}=0.62$$

第４節 試料の前処理

１．試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 4-4-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

図 4-4-2　試料の前処理から測定までのフローの例

２．試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

1)　水　JIS K0557 に規定する A4（又は A3）の水
2)　メタノール　JIS K8891 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3)　アセトン　JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4)　トルエン　JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5)　ジクロロメタン　JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6)　ヘキサン　JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
7)　デカン　測定に支障のない品質のもの
8)　ジメチルスルホキシド (DMSO)　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの
9)　塩酸　JIS K8180 に規定するもの、又は同等の品質のもの
10)　硫酸　JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
11)　硝酸銀　JIS K8550 に規定するもの、又は同等の品質のもの
12)　硫酸ナトリウム　JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
13)　ヘキサン洗浄水　1）の水を 6）のヘキサンで十分洗浄したもの
14)　シリカゲル　JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

15) **硫酸（44%質量分率）シリカゲル** JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもの

16) **硝酸銀 (20%質量分率）シリカゲル** 14）のシリカゲル 100 g に対して 11)の硝酸銀で調製した硝酸銀溶液（625 g/L) 40 mL を加えた後、ロータリーエバポレータで水分を完全に除去する。硝酸銀シリカゲルは、調製後、密閉できる着色容器に入れ、デシケーター中に保存する。

17) **アルミナ** JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等の品質のもので、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているもの

18) **窒素** JIS K1107 に規定する高純度窒素 1 級

19) **ガラスウール** JIS K8251 に規定するもの、又は同等の品質のもの

３．器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、ブランク試験等によって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がフッ素樹脂製のものを用いてもよい

3.2 高速溶媒抽出装置

ダイオネクス製 ASE-200 又はこれと同等品。ASE 用の器具一式 (セルボディー、セルエンドキャップアセンブリ、溶媒ボトル、補修ボトルアセンブリ、コンプレッサー等)

3.3 濃縮器

クデルナーダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない。

3.4 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ管

内径 14mm、長さ 300mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.5 アルミナカラムクロマト管

内径 6mm、長さ 50mm のガラス製カラムクロマトグラフ管

3.6 ヒーター

カラムクロマト管を包み込み 100℃程度まで加熱することができるもの

3.7 送液ポンプ

流速の調節が毎分 0.1 ～ 10 mL の範囲内で可能であって、流速の変動が±2%以内のもの

４．前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 に準拠し、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 4-4-3 に JISⅡ形装置を用いて採取した排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

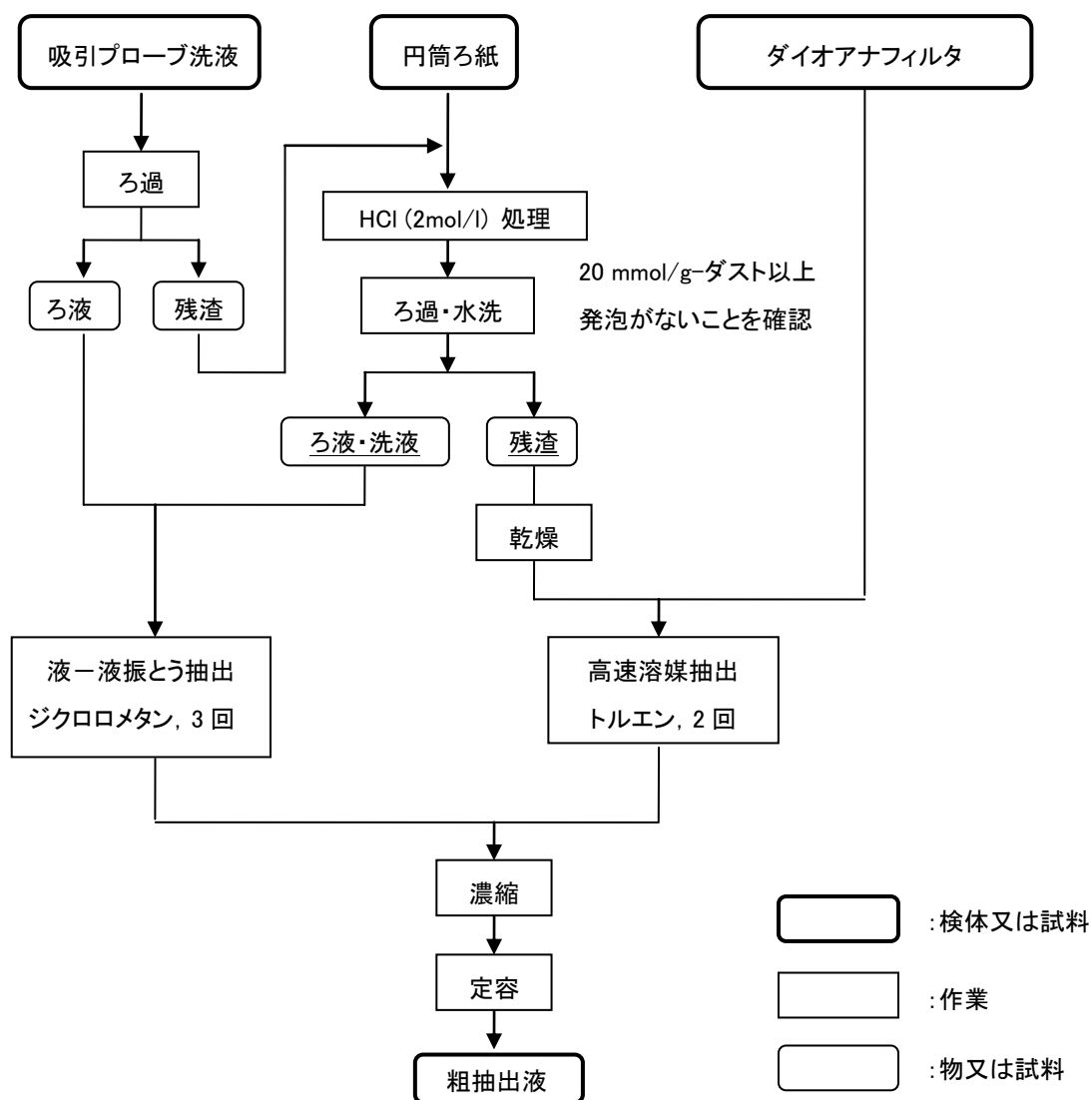



図 4-4-3　排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

2)　ばいじん及び燃え殻

平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2) 又は下記の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 4-4-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

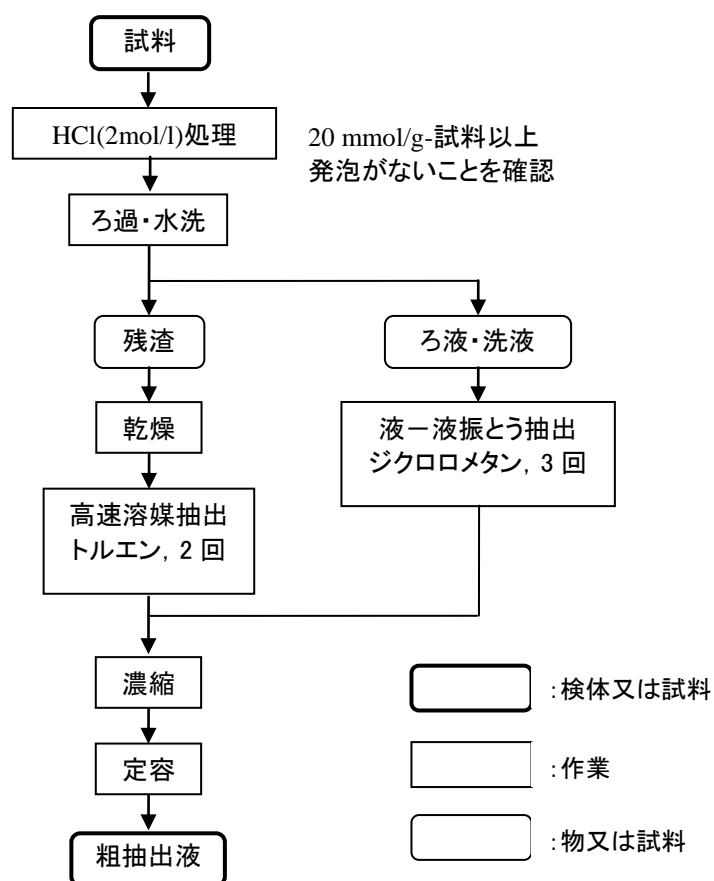



図 4-4-4　ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

高速溶媒抽出は下記条件で 2 回行う

溶媒	:	トルエン
加熱	:	7 分
静置	:	2 分
フラッシュ	:	70%
パージ	:	60 秒
サイクル	:	5 回
温度	:	150℃
圧力	:	2000psi

4.3　クリーンアップ

図 4-4-5　にクリーンアップのフローの例を示す。

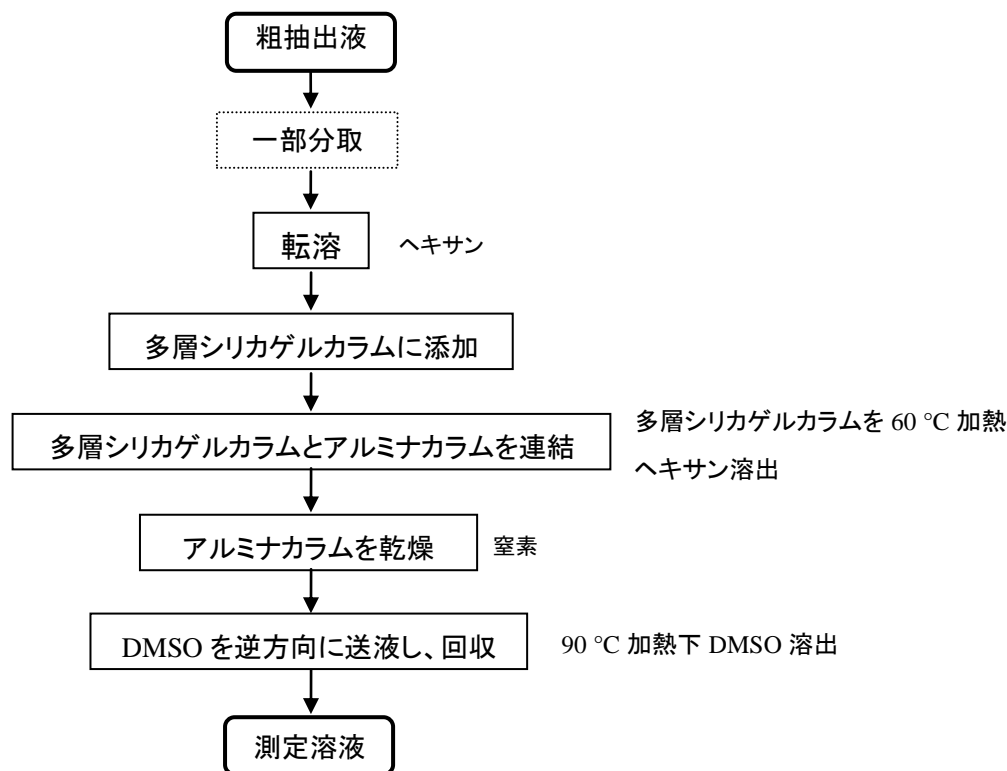



図 4-4-5　　クリーンアップのフローの例

1) 抽出液の分取

(1) 抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。排出ガスについては 1.0m³N 相当量、ばいじん及び燃え殻については 1.0g 相当量の抽出液を 1 回のクリーンアップの目安とする。

(2) あらかじめ、デカン 0.4mL を入れた受器に適量の抽出液を入れ、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この濃縮液に適当量のヘキサンを加え、ロータリーエバポレータで乾固寸前まで濃縮する。この操作を 3 回程度繰り返しトルエンを除去する。その後、次に示す多層シリカゲルカラム－アルミナカラム操作によってクリーンアップを行う。

2) 精製カラムの作製

(1) 多層シリカゲルカラム

3.3 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、シリカゲル 2.3g、硫酸（44%質量分率）シリカゲル 10.4g、シリカゲル 0.2g、硝酸銀（20%質量分率）シリカゲル 3.6g、シリカゲル 1.5g を順次充填する。このカラムを図 4-4-6 に示す。

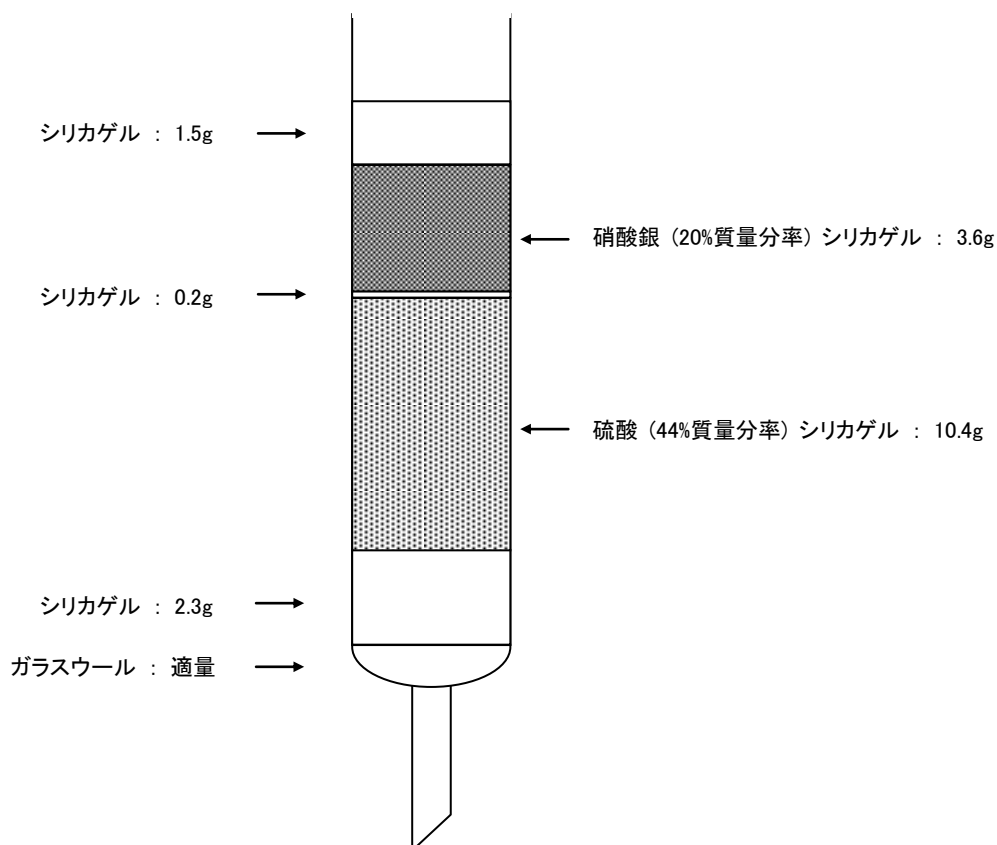



図 4-4-6　多層シリカゲルカラムの例

(2)　アルミナカラム

3.4 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、アルミナ 1.0g 程度充填し、その上からガラスウールを詰める。このカラムを図 4-4-7 に示す。

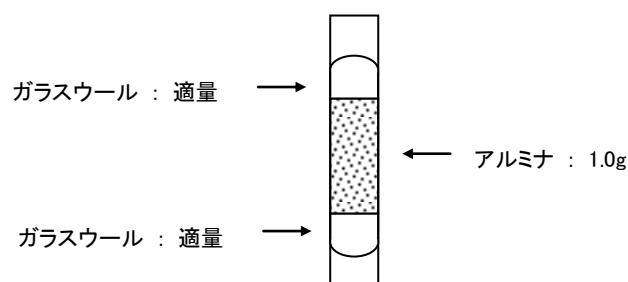



図 4-4-7　アルミナカラムの例

3) クリーンアップ操作

(1) 図 4-4-8 に示す様に、2) の(1)多層シリカゲルカラム、(2)アルミナカラムを連結し、多層シリカゲルカラムを構成する上端のシリカゲル、硝酸銀シリカゲル及び硫酸シリカゲルの上半分の部分を覆うようにヒーターをセットする。

(2) 濃縮した試料にヘキサンを加え、多層シリカゲルカラムに添加する。添加する試料の液量は容器の洗液を合わせて最大 5mL までとする。

(3) ヒーターにより 60℃で 10 分間カラムを加熱する。

(4) 60℃加熱下、ヘキサン 85 mL を送液（2.5 mL/min）する。

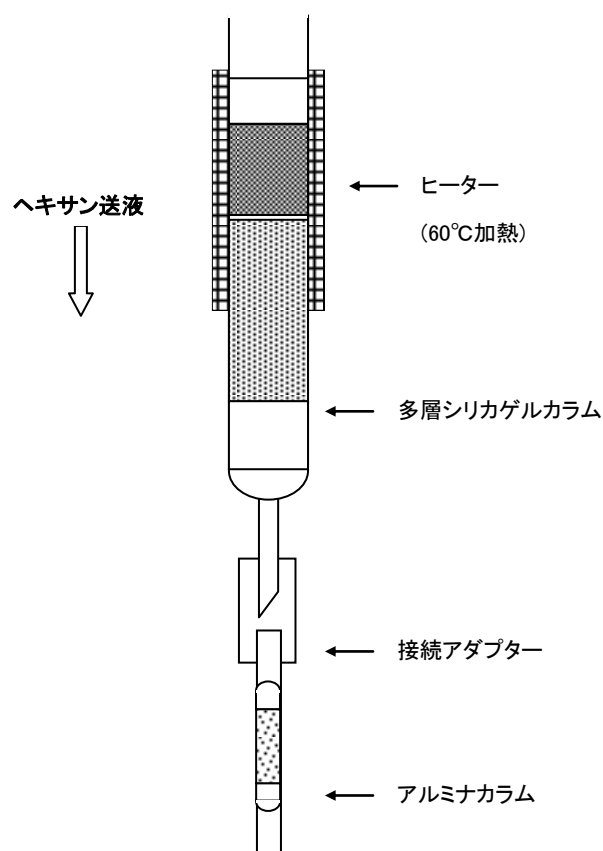



図 4-4-8 多層シリカゲルカラムとアルミナカラムの組み立て例

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

(1) 3)の(4)の操作後、アルミナカラムに窒素を通じ、ヘキサンを除去する。

(2) アルミナカラムを包み込むようにヒーターをセットし、90℃で 10 分間加熱する。

(3) 90℃加熱下、3）の(4)のヘキサンの送液方向とは逆方向に、即ちアルミナカラム下端側から DMSO 2.5mL を送液（2.5mL/min）し、上端側から溶出する DMSO 溶液約 1mL を予め秤量済みのバイアル瓶に回収する。図 4-4-9 にアルミナカラムを反転させない場合の操作例を示した。

(4) 回収後、バイアル瓶を秤量し、密栓後、室温で暗所に保存する。秤量の差分を DMSO 定容量とする。

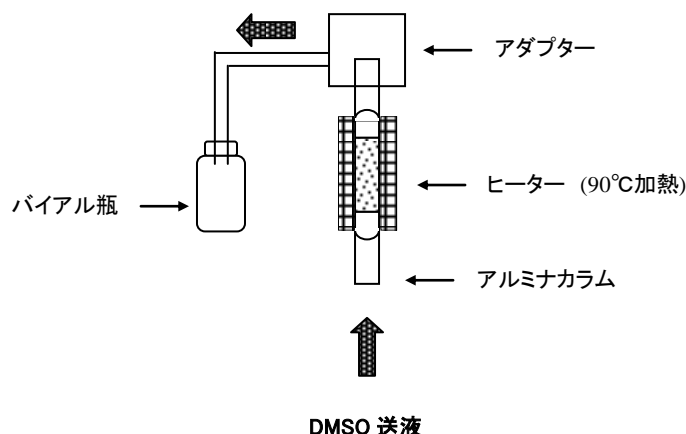



図 4-4-9　アルミナカラムを反転させない場合の DMSO への置換操作の例

第５節 測定

１．測定の概要

本方法は、ダイオキシン類の毒性等量との相関性の高い、五塩化ジベンゾフラン類に特異的に反応する抗ダイオキシン類モノクローナル抗体及び抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法に基づく生体分子間相互作用解析技術を利用したフロー式免疫測定法によりダイオキシン類の毒性等量を測定する方法である。

2,4,5-トリクロロフェノキシヘキサノイルアミノプロピオン酸（TCPHA）を用いて検量線を作成し、試料の蛍光量から算出した実測濃度を、排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数で除することにより、測定量（毒性等量）を算出する。

２．使用キット、試薬、器具及び装置

2.1　使用キット

使用キット（抗ダイオキシン類モノクローナル抗体には、マウス由来の融合細胞（ハイブリドーマ）から収得した 2,3,4,7,8－五塩化ジベンゾフランを特異的に認識する抗体を、抗原固相化ビーズには、2,4,5－トリクロロフェノキシ誘導体及び高分子担体から合成したものを、検量線作成用標準品には、2,4,5-トリクロロフェノキシヘキサノイルアミノプロピオン酸を使用する。）は、以下の試薬等から構成されるものである。

1) **測定セル（抗原固相化ビーズ充填済）**　５個入り
2) **抗ダイオキシン抗体溶液（×10 濃度）**5mL
3) **抗体溶液希釈用バッファー液**　45mL
4) **2,4,5-トリクロロフェノキシヘキサノイルアミノプロピオン酸(TCPHA)校正液**　4mL
5) **キャリーオーバー洗浄液**　50mL
6) **CD(検量線データ入り）**　１枚
7) **添付書類**

2.2　試薬

測定に用いる使用キット以外の試薬は，次による。

1) **水**　JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水、又は同等の品質のもの
2) **リン酸水素二ナトリウム十二水和物**　JIS K8001 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3) **塩化ナトリウム**　JIS K8001 に規定するもの、又は同等の品質のもの
4) **リン酸二水素カリウム**　JIS K8001 に規定するもの、又は同等の品質のもの
5) **塩化カリウム**　JIS K8001 に規定するもの、又は同等の品質のもの
6) **リン酸緩衝生理食塩液（PBS（-））**　JIS K0461 に規定するもの、又は同等の品質のもの
7) **ウシ血清アルブミン（BSA）**　JIS L1902 で使用されている生化学試験用のもの
8) **水酸化ナトリウム（NaOH）**　JIS K8576 に規定するもの、又は同等の品質のもの
9) **アジ化ナトリウム（NaN_3）**K9501 に規定するもの、又は同等の品質のもの
10) **エタノール**　JIS K8101 に規定するもの、又は同等の品質のもの
11) **試料調製用緩衝液**　1000mL の水にリン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.79g、 塩化ナトリウム 7.60g、 リン酸二水素カリウム 0.20g、 塩化カリウム 0.20g、 アジ化ナトリウム 0.20g 、 ウシ血清アルブミン 1.0g を十分に溶解させた後、孔径 0.45μm のフィルターを用いてろ過したもの
12) **測定用緩衝液**　800mL の水にリン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.79g、塩化ナトリウム 7.60g、リン酸二水素カリウム 0.20g、 塩化カリウム 0.20g、 アジ化ナトリウム 0.20g、 ウシ血清アルブミン 1.0g を十分に溶解させた後、DMSO 50mL を加え攪拌する。水を用いて全量を 1000mL とし、再度攪拌した後、孔径 0.45μm のフィルターを用いてろ過したもの
13) **ジメチルスルホキシド（DMSO）**　JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの
14) **再生液**　95mL の水に水酸化ナトリウム 0.10g を溶解させた後、5mL の DMSO を加え攪拌溶解させたもの

2.3　器具及び装置

測定に用いる器具及び機器は、次による。

1) **蛍光検出装置**　キットで供給される測定セルを装着し、励起波長 650nm を発光でき、得られる蛍光波長 665nm の蛍光強度を精度良く検出できる装置
2) **フィルター(0.45μm)**　JIS K3802 に規定するもの、又は同等の品質のもの
3) **試料瓶(ガラス製)**　5～10mL 程度の遮光の出来る褐色瓶
4) **マイクロピペット用チップ**　JIS K 0970 に規定するもの、又は同等の品質のもの　200μL 、1000μL
5) **マイクロピペット**　JIS K 0970 に規定するもの、又は同等の品質のもの　10～100μL、20～200μL、100～1000μL
6) **送液システム**　3 種類以上の溶液（反応液、緩衝液、再生液等）を正確かつ、精密な流量、流速で送液できるシステム
7) **送液チューブ**　ダイオキシン類の吸着を抑制した内径 0.5mm のステンレス製のチューブ

３．キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注点を遵守すること。

1) 測定セル、抗ダイオキシン抗体溶液 (×10濃度) および抗体溶液希釈用バッファー液は、冷蔵庫(2～8℃)

にて保管すること。

2) 抗ダイオキシン抗体溶液（×10濃度）および抗体溶液希釈用バッファー液の有効期間は、納入より2ヶ月以内。ただし、抗体溶液（×1濃度）へ調製後は、1ヶ月間以内に使い切ること。

3) 測定セルの有効期間は、納入より2ヶ月以内。ただし、開封後は1日以内に使用すること。

4) TCPHA校正液は必ず常温遮光下で保存すること。納入時に凍っている場合は、常温で解凍し十分に混合すること。品質に影響しない。

5) キットを保管する場合は、保存場所、保存方法、汚染の配慮、温度及び湿度の情報を記録し、保存すること。

4．測定操作

4.1　測定方法のフロー

前処理を行ったダイオキシン類試料を用いて結合平衡除外法を用いた測定により定量する。測定方法のフローを図 4-4-10 に示す。

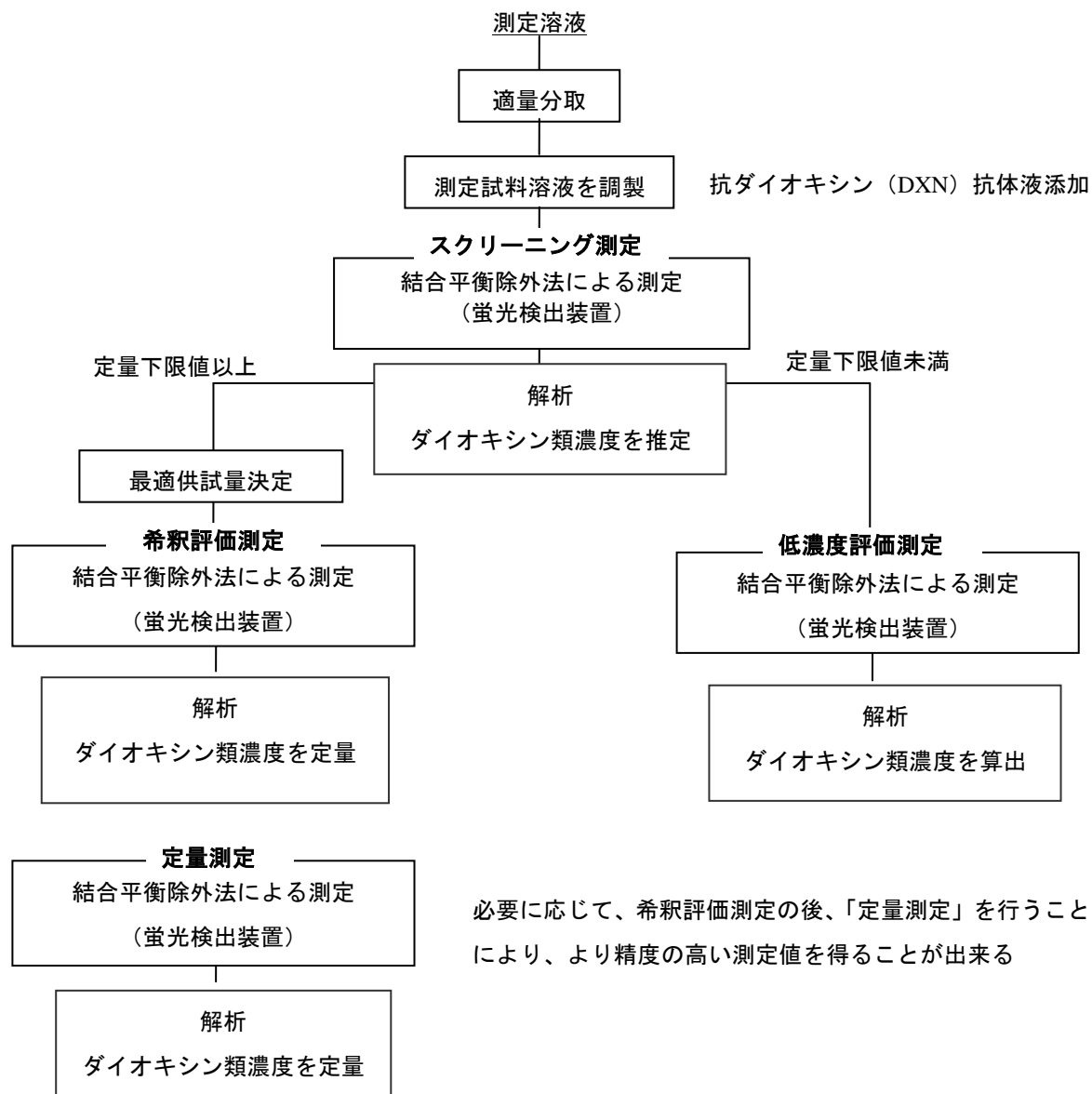



図 4-4-10 測定方法のフロー

4.2　測定試料調製

1)　ブランク試料溶液（B_0値）の調製

DMSO 400μL と試料調製用緩衝液 5600μL を試料瓶に加え泡立てないように攪拌混合した後、抗ダイオキシン類抗体液 2000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し調製する。

2)　校正試料溶液の調製

校正液 200μL と試料調製用緩衝液 2800μL を試料瓶に加え泡立てないように攪拌混合した後、抗ダイオキシン類抗体液 1000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し調製する。

3)　測定試料溶液の調製（スクリーニング測定用）

スクリーニング測定時の試料溶液調製例を表 4-4-1 に示す。試料量と DMSO 量の合計が 200μL となるように下記の表 4-4-1 に従い、試料と DMSO を試料瓶に加え軽く混合する。そこに試料調製用緩衝液 2800μL を追加し、泡立てないように攪拌混合した後、さらに抗ダイオキシン類抗体液 1000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し試料を調製する。

表 4-4-1　スクリーニング測定時の測定試料溶液調製例(注１)

	B_0溶液	校正試料溶液	測定試料溶液
DMSO 量	400μL	0μL	(200-X) μL
試料量	—	TCPHA 200μL	前処理済み試料 XμL
試料調製用緩衝液量	5600μL	2800μL	2800μL
抗ダイオキシン類抗体液量	2000μL	1000μL	1000μL
測定時の調製試料量	8000μL	4000μL	4000μL

（注 1)　X は前処理での前処理量と調製液量の条件にあわせて設定し、その試料量において一律に行う。排出ガスの場合約 0.022m^3N 相当量、ばいじん及び燃え殻の場合約 44mg 相当量。(例　排出ガス 1m^3N/0.9mL 、ばいじん及び燃え殻 1g/0.9mL の前処理済み調製試料を用いる場合の試料量(X)は排出ガスの場合 20μL、ばいじん及び燃え殻の場合 40μL となる)

4)　測定試料溶液の調製(希釈評価測定用)

希釈評価測定時の試料溶液調製例を表 4-4-2 に示す。試料量と DMSO 量の合計が 200μL となるように下記の表 4-4-2 に従い、算出した各試料量とそれぞれに対応した DMSO を試料瓶に加え軽く混合する。そこに試料調製用緩衝液 2800μL を追加し、泡立てないように攪拌混合した後、さらにそれぞれに抗ダイオキシン類抗体液 1000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し 3 試料を調製する。

表 4-4-2　希釈評価測定時の測定試料溶液調製例（注 2)

	希釈評価試料１	希釈評価試料２	希釈評価試料３
DMSO 量	(200－0.5X)μL	(200－X) μL	(200－1.5X) μL
試料量	前処理済み試料 0.5XμL	前処理済み試料 XμL	前処理済み試料 1.5XμL
試料調製用緩衝液量	2800μL	2800μL	2800μL
抗ダイオキシン類抗体液量	1000μL	1000μL	1000μL
測定時の調製試料量	4000μL	4000μL	4000μL

(注 2)スクリーニング測定結果より以下の式を用いて、希釈評価測定用最適供試量を求める。

$$X = \frac{0.0095 \times V}{C}$$

ここに、　X ：　希釈評価測定用最適供試量（μL）

V ：　測定への試料量(μL) (例　排出ガス：0.022m³N 相当量)

C ：　標準物質相当量（TCPHA 換算値μg/mL）

5)　測定試料溶液の調製(低濃度評価測定用)

低濃度測定時の試料溶液調製例を表 4-4-3 に示す。試料量と DMSO 量の合計が 200μL となるように下記の表 4-4-3 に従い、各試料量とそれぞれに対応した DMSO を試料瓶に加え軽く混合する。そこに試料調製用緩衝液 2800μL を追加し、泡立てないように攪拌混合した後、さらに抗ダイオキシン類抗体液 1000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し 2 試料を調製する。

表 4-4-3　低濃度評価測定時の測定試料溶液調製例（注 3）

	低濃度評価試料 1	低濃度評価試料 2
DMSO 量	(200-X) μL	(200-2X) μL
試料量	前処理済み試料 XμL	前処理済み試料 2XμL
試料調製用緩衝液量	2800μL	2800μL
抗ダイオキシン類抗体液量	1000μL	1000μL
測定時の調製試料量	4000μL	4000μL

(注 3)　排出ガスの場合約 0.089m³N 相当量、ばいじん及び燃え殻の場合約 89mg 相当量。（例　排出ガス 1m³N/0.9mL 、ばいじん及び燃え殻 1g/0.9mL の前処理済み調製試料を用いる場合の試料量(X)は 80μL）

6)　測定試料溶液の調製(定量測定用)

定量測定時の試料溶液調製例を表 4-4-4 に示す。下記の表 4-4-4 に従い、算出した試料量と DMSO を試料瓶に加え軽く混合する。そこに試料調製用緩衝液 2800μL を追加し、泡立てないように攪拌混合した後、さらに抗ダイオキシン類抗体液 1000μL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し試料を調製する。

表 4-4-4　定量測定時の測定試料溶液調製例（注 4）

	定量試料
DMSO 量	(200－X) μL
試料量	前処理済み試料 XμL
試料調製用緩衝液量	2800μL
抗ダイオキシン類抗体液量	1000μL
測定時の調製試料量	4000μL

(注 4)　希釈評価測定結果より Y=aX の原点を通る直線式が得られ、この直線式より定量測定に用いる定量測定用最適供試量を求める。

$$X = \frac{0.0095}{a}$$

ここに、　X ：定量測定用最適供試量（μL）

a ：希釈評価測定結果より得られた原点を通る直線式の傾き

4.3　結合平衡除外法によるダイオキシン類の測定

測定セルへの送液は、測定対象物の非特異的吸着を抑制するために送液チューブを用いて行うこと。

1)　測定操作のフロー

測定セルを用いた試料溶液測定のフローを図 4-4-11 に示す。

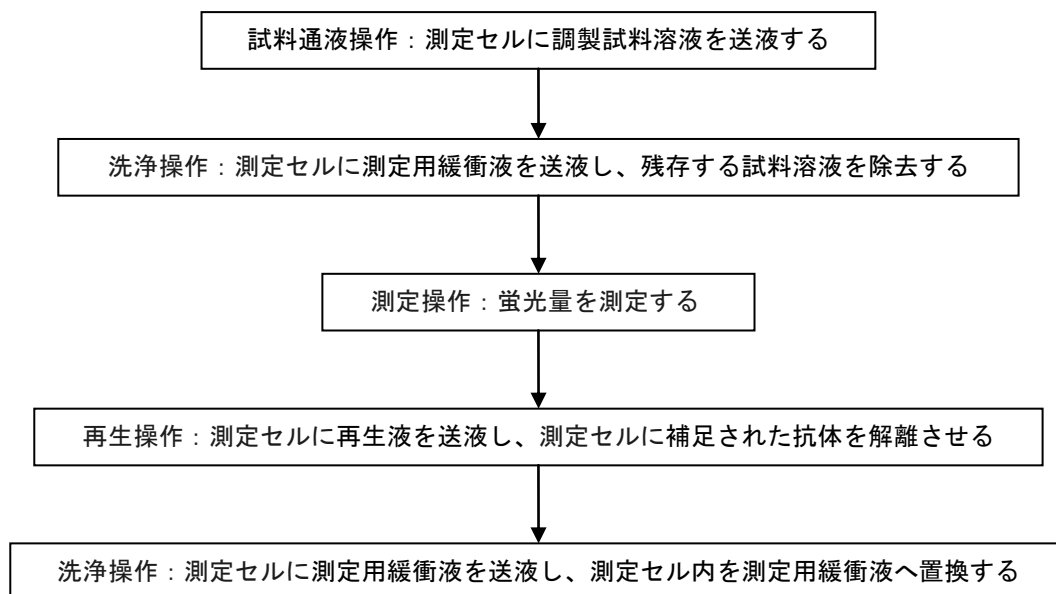



図 4-4-11　試料溶液測定のフロー

2)　スクリーニング測定

(1) 4.2-1)～3)に従って測定用試料を調製する。

(2) 測定セルに 4.2-1)ブランク試料溶液 0.4mL を流速 0.75mL/min で送液する（以下、試料通液操作と称する）。

(3) 測定用緩衝液 0.75mL を流速 0.75mL/min で送液（以下、洗浄操作と称する）し、測定セル部に残存する試料溶液を洗浄除去する。

(4) 蛍光量を測定する（以下、測定操作と称する）（B_0 値）。

(5) 測定セルに再生液 0.75mL を流速 0.75mL/min で送液（以下、再生操作と称する）し、測定セルに結合した抗ダイオキシン類抗体を解離させる。

(6) 洗浄を行い、測定セルを元の状態に復帰させる。

(7) 測定セルに 4.2-2)の校正試料溶液 0.4mL を流速 0.75mL/min で送液する。次に洗浄操作を行い、蛍光量を測定する。

(8) 測定セルの再生操作後、洗浄操作を行い、測定セルを元の状態に復帰させる。

(9) 測定セルに 4.2-3)の測定試料溶液 0.4mL を流速 0.75mL/min で送液する。次に洗浄操作を行い、蛍光量を測定する（B 値）。

(10) 測定セルの再生操作後、洗浄操作を行い、測定セルを元の状態に復帰させる。

(11) 1 個の測定セルで検体数に応じ、図 4-4-11 に示す操作を繰り返し、測定を行う。

次に引き続き、定量下限未満の場合は低濃度評価測定、定量下限以上の場合は希釈評価測定を行う。

3)　希釈評価測定　(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

(1) 4.2-1)、4.2-2)、4.2-4)に従って測定用試料を調製する。

(2) 図 4-4-11 に示すフロー（試料通液操作、洗浄操作、測定操作、再生操作、洗浄操作）に従って測定を行う。

4)　低濃度評価測定　(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

(1) 4.2-1）、4-2-2)、4-2-5）に従って測定用試料を調製する。

(2) 図 4-4-11 に示すフロー（試料通液操作、洗浄操作、測定操作、再生操作、洗浄操作）に従って測定を行う。

5)　定量測定　(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

(1) 4.2-1）、4-2-2)、4-2-6）に従って測定用試料を調製する。

(2) 図 4-4-11 に示すフロー（試料通液操作、洗浄操作、測定操作、再生操作、洗浄操作）に従って測定を行う。

５．定量

本法においては、その原理に基づき、同一ロットの試薬等を用いた場合、測定毎に毎回検量線を取得する必要がない。特に、図 4-4-11 に示すフローを自動で行う場合、常に校正液を用いた補正を行う事で予め作成した検量線の情報を基に定量値への換算を行う事が可能である。

ただし、本測定系は、測定時における環境温度と測定感度が連動することから、検量線を作成する場合は、環境温度について記録する。

5.1　検量線の作成

濃度既知の TCPHA 標準溶液の 6 濃度水準以上に対して蛍光量をプロットし、検量線を作成する。

1) TCPHA 標準溶液

表 4-4-5 に検量線作成用 TCPHA 標準溶液の調製例を示す。TCPHA 標準溶液（STD7 ; 20µg/mL)を段階希釈により STD1～STD6 の濃度系列を調製する。

2) 測定試料溶液の調製

表 4-4-5 に検量線作成用測定試料溶液の調製例を示す。まず、7 つの試料瓶に濃度ごとの TCPHA 標準溶液を 200µL ずつ添加する。その後、試料調製用緩衝液 2800µL を追加し、泡立てないように攪拌混合した後、さらに抗ダイオキシン類抗体液 1000µL を追加し、再度泡立てないよう穏やかに攪拌混合し調製する。測定試料溶液の濃度は試料調製用緩衝液と抗ダイオキシン類抗体を添加することにより TCPHA 標準溶液を 20 倍希釈したことになる。なお、TCPHA 標準溶液を含まない DMSO のみをブランクとする。

表 4−4−5　検量線作成用測定試料溶液の調製例

溶液	単位	ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7
TCPHA標準溶液	µg/m*l*	0	0.01	0.10	0.19	0.40	1	4	20
測定試料溶液	µg/m*l*	0	0.0005	0.005	0.0095	0.02	0.05	0.2	1

3) 検量線の作成

各濃度に調製した TCPHA 標準溶液の測定を行い、蛍光検出装置により波長 650nm における蛍光量を測定する。TCPHA 標準物質設定濃度及び蛍光量から、下記に示す 4-パラメーターの式の各係数（a～d）を算出する。

検量線作成及びパラメーターの例を図 4-4-12 に示す。

$$y = \left(\frac{a-d}{1+(X/c)}\right)^{b} + d$$

ここに、y　：測定値

d　：曲線における下方漸近値（最小検出器測定結果)(B/B0)

a　：曲線における上方漸近値（最大検出器測定結果)(B/B0)

X　：標準物質の質量濃度(μg-TCPHA / mL)

c　：IC_{50} における標準物質の質量濃度(μg-TCPHA/mL)

b　：曲線の傾き

測定試料溶液濃度 μg/mL	B/B_0 値
0.0005	0.970
0.005	0.845
0.0095	0.745
0.02	0.603
0.05	0.411
0.2	0.178
1	0.052

4-パラメーター式の各係数

a	最大 B/B_0	0.997
b	曲線の傾き	0.878
c	IC_{50} 濃度	0.0326
d	最小 B/B_0	0.007

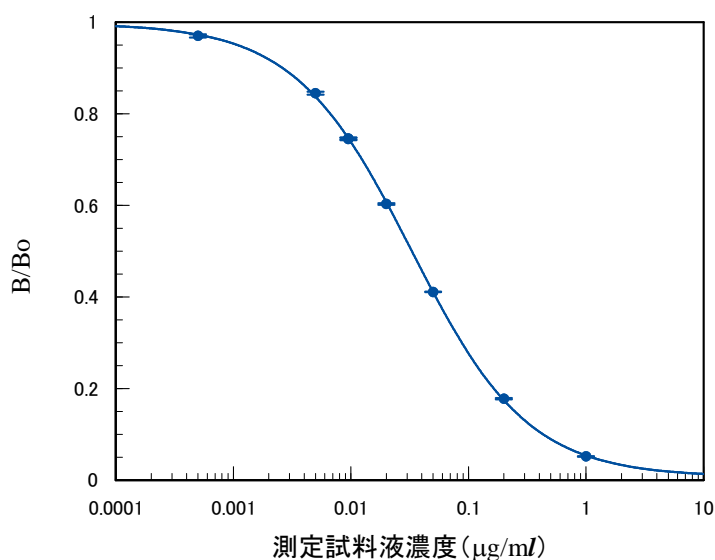



図 4-4-12 検量線作成及びパラメーターの例

5.2　検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

定量操作が適切に行われているかどうかを確認するため、測定担当者は、測定毎の感度校正として使用する校正液（0.0095μg/mL）の測定値を、管理図に記録し保存する。また同時に測定時の環境温度を記録する。

管理図による処置基準は、管理限界（μ±2σ）からの逸脱状況及び図の傾向等に応じて下記のとおりとする（μ：工程平均、σ：測定値 の標準偏差)。

検量線作成時の環境温度±1℃の範囲内で測定された校正液の測定値が 1 点でも管理限界を超えた場合は、原因の究明と改善を行うとともに、再測定する。改善のために講じた措置及び再測定の結果について記録をする。また、管理限界内であっても基準値に対して、一定の傾向で外れていくような状態又は偏った測定量が続くような状態においては、原因の究明を行い、必要に応じ、改善を行うとともに、再測定する。

5.1 での校正試料溶液(0.0095μg/mL）の測定を 25℃で行い、検量線による換算値（ng-TCPHA/mL）を算出し、管理図にプロットする。34 セルについて行った一例を表 4-4-6、表 4-4-7、図 4-4-13 に示す。

表 4-4-6 管理図用データ導出例

測定回数	B/B0	換算値 (10^{-3}μg-TCPHA/ml)
1	0.742	9.77
2	0.763	8.57
3	0.744	9.67
4	0.748	9.46
5	0.737	10.09
6	0.744	9.66
7	0.749	9.39
8	0.766	8.42
9	0.744	9.65
10	0.748	9.43
34	0.741	9.81

表 4-4-7　管理図用データ算出例

工程平均	μ	9.31
測定値の標準偏差	σ	0.50
測定値の変動係数	CV	5.34%
管理限界	μ±2σ	8.31～10.30

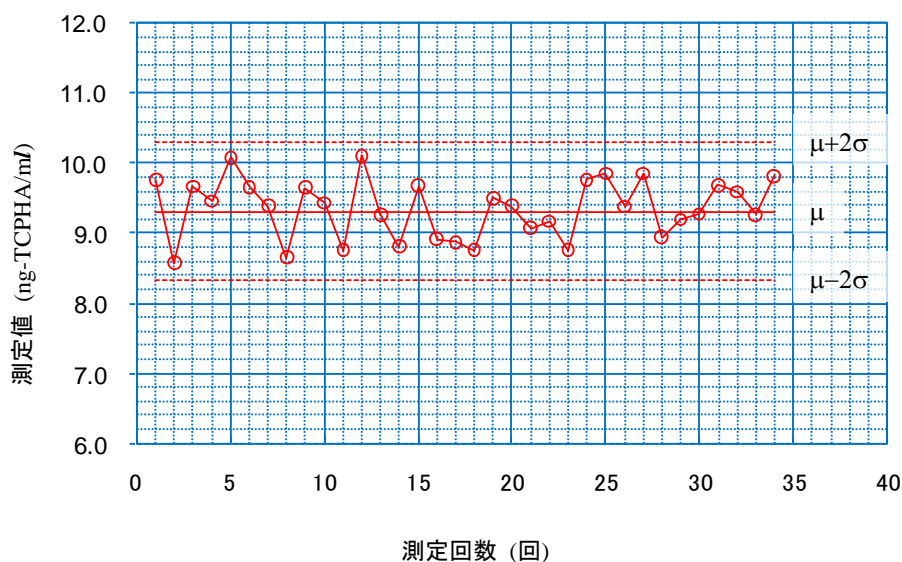



図 4-4-13　管理図の例

5.3 測定試料の定量

各環境試料での測定において、阻害率（B/B_0 %) 65～80% の範囲かつ希釈評価測定での直線性が認められる場合、その測定結果(B/B_0)を検量線に内挿し、得られた希釈試料中実測濃度を用いて、次式により(TCPHA 標準溶液相当)、実測濃度（排出ガスにおいては ng/m³N、ばいじん及び燃え殻においては ng/g）を算出する。

$$C_S = X \times n \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{v}{V}$$

ここに、Cs　:　(TCPHA 標準溶液相当）実測濃度（μg/m³N 又は μg/g）

X　:　測定試料溶液実測(TCPHA 標準溶液相当)濃度（μg/mL）（注5）

N　:　希釈倍率

v　:　測定用試料の液量（mL）

V_E　:　抽出液量（mL）

V'_E　：抽出液分取量（mL）

V　：試料採取量（m³N 又は g）

（注5）測定試料溶液実測濃度はセル間誤差等の影響があるため、校正試料での補正を行う。

$$X = X_{試料} \times \frac{0.0095}{X_{校正試料}}$$

ここに、　$X_{試料}$　：環境試料溶液（TCPHA 標準溶液相当）実測値（μg/mL）

$X_{校正試料}$　：校正試料溶液の実測値（μg/mL）

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正は、次式による。

$$V = \frac{9}{21 - O_S} \times C_S$$

ここに、　C　：酸素の濃度On における実測濃度（ng/m³N）

Os　：排出ガス中の酸素の濃度（注6）(%)

Cs　：排出ガス中の実測濃度（ng/m³N）

（注6）排出ガス中の酸素の濃度が20%を超える場合は、Os=20 とする。

６．検出下限及び定量範囲

6.1　標準物質における検出下限及び定量範囲

標準物質における検出下限及び定量範囲の確認は、定量値の変動係数(CV%)が 30%以下となる点を検出下限とし、20%以下となる上下 2 点間を定量範囲とする方法で行う。ただし、検量線において CV が 30%となる点の濃度における B/B_0値が 0.9 を超える場合、この数値を適応せずに B/B_0値が 0.9 を示す濃度を検出下限値とする。また、同様に CV が 20%となる点の濃度における B/B_0値が 0.85 を超える場合、この数値を適応せずに B/B_0値が 0.85 を示す濃度を定量下限値とする。この場合、それぞれの CV はより小さくなるため、規定よりも厳しい判定となる。

1) 検出下限等算出用標準溶液の調製例

表4-4-8 に示す濃度の検出下限等算出用標準溶液を調製する（詳細は5. 1−2）を参照）。

表 4−4−8 検出下限等算出用標準溶液の調製例

溶液	単位	ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8
TCPHA標準溶液	μg/m*l*	0	0.01	0.1	0.19	0.4	1	4	20	40
測定試料溶液	μg/m*l*	0	0.0005	0.005	0.0095	0.02	0.05	0.2	1	2

2) 検出下限及び定量範囲の算出

1)で調製した検出下限等算出用標準溶液を n=5 以上で測定した検量線より定量し、測定量(毒性等量)の平均、標準偏差及び変動係数(CV)を算出し、精度プロファイルを作図し、検出下限及び定量範囲を図より読み取る。検出下限及び定量範囲の算出例を表 4-4-9、図 4-4-14、図 4-4-15 に示す。

表 4-4-9　測定結果例(n=6)

濃度	測定値(Y)：B/B0値							YのSD	YのCV
μg/ml	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	Ave	σ	%
0.0005	0.955	0.964	0.962	0.958	0.959	0.964	0.961	0.004	0.4%
0.005	0.826	0.829	0.832	0.821	0.821	0.825	0.826	0.005	0.5%
0.0095	0.716	0.720	0.721	0.713	0.714	0.719	0.717	0.003	0.4%
0.02	0.574	0.581	0.579	0.567	0.569	0.574	0.574	0.006	1.0%
0.05	0.371	0.382	0.375	0.364	0.376	0.364	0.372	0.007	1.9%
0.2	0.163	0.168	0.163	0.160	0.168	0.163	0.164	0.003	1.9%
1	0.047	0.051	0.050	0.054	0.055	0.054	0.052	0.003	6.1%
2	0.031	0.034	0.029	0.036	0.036	0.037	0.034	0.003	9.7%

濃度	定量値(X)：μg/ml							Xの CV(r_c)
μg/ml	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	Ave	%
0.0005	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	31.2%
0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005	0.005	5.4%
0.0095	0.010	0.010	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010	3.3%
0.02	0.020	0.019	0.020	0.021	0.021	0.020	0.020	2.2%
0.05	0.051	0.049	0.050	0.053	0.050	0.053	0.051	1.6%
0.2	0.189	0.181	0.189	0.194	0.181	0.188	0.187	1.5%
1	1.230	1.075	1.099	0.974	0.934	0.962	1.046	6.1%
2	2.837	2.373	3.377	2.049	1.994	1.933	2.427	57.7%

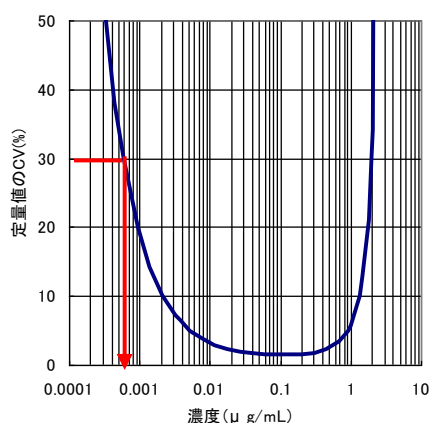



図 4-4-14　検出下限値の求め方

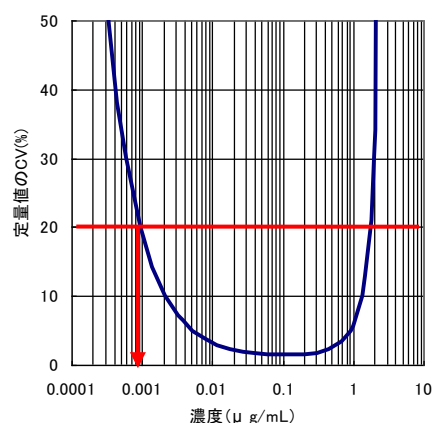



図 4-4-15　定量下限値及び定量上限値の求め方

図の精度プロファイルにより求めた検出下限値は 0.0006μg/mL (B/B_0=0.959)であり、この濃度は検量線において B/B_0 値が 0.9 を超えることから、B/B_0 値が 0.9 を示す濃度を検出下限値(0.0022μg/mL)とする。また、定量下限は 0.0009μg/mL (B/B_0=0.945)であり、この濃度は検量線において B/B_0 値が 0.85 を超えていることから、B/B_0 値が 0.85 を示す濃度を定量下限値(0.0038μg/mL)とする。

表 4-4-10　標準物質における検出下限並びに定量下限の実用例

検出下限試料 μg/mL	定量下限 μg/mL
0.0022	0.0038

TCPHA 標準溶液における検出下限及び定量範囲は、少なくとも 6 ヶ月に 1 回十分な性能が得られていることを確認する。また、測定条件が大幅に変わった場合(機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等)にも、確認する。

6.2　試料における検出下限及び定量下限

試料における検出下限及び定量下限は、試料量と前処理を経た最終定容量の数値と、反応液中の TCPHA 標準溶液における検出下限及び定量下限から理論的に算出する。試料における検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終定容量等によって異なってくるため、試料ごとに求める。

$$C_{DL} = Q_{DL} \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

$$C_{QL} = Q_{QL} \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、　C_{DL}　：環境試料における検出下限（μg/m³N　又は　μg/g）

C_{QL}　：環境試料における定量下限（μg/m³N　又は　μg/g）

Q_{DL}　：標準物質における検出下限（μg/mL, 測定試料溶液中）

Q_{QL}　：標準物質における定量下限（μg/mL, 測定試料溶液中）

n　：希釈倍率(測定試料溶液中の測定用試料量の割合)

（例　測定試料溶液0.40mL中に測定用試料0.02 mLの場合、n=20）

v　：測定用試料の液量（mL）

V_E　：抽出液量（mL）

V'_E　：抽出液分取量（mL）

V　：試料採取量（m³N　又は　g）

なお、Q_{DL}、Q_{QL}には、第 5 節「6.1 標準物質における検出下限及び定量範囲」に従い算出した検出下限と定量下限を用いる。「6.1 の 2）検出下限及び定量下限の算出例」における表 4-4-10 に示した例では、標準物質における検出下限は 0.0022μg/mL、定量下限は 0.0038μg/mL である。

表 4-4-11　試料における検出下限算出例（排出ガス、ばいじん及び燃え殻）

測定媒体	使用キット	試料調製				媒体中濃度
	検出下限 μg/mL	採取量(注7) m³N or g	分取液量 / 抽出液量	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度(注8) μg/m³N or g
排ガス ばいじん 燃え殻	0.0022	2	10/20	0.9	20	0.040

(注 7) 排出ガス m³N、ばいじん及び燃え殻 g
(注 8) 排出ガスμg/m³N、ばいじん及び燃え殻　μg/g

表 4-4-12　試料における定量下限算出例（排出ガス、ばいじん及び燃え殻）

測定媒体	使用キット	試料調製				媒体中濃度
	定量下限 μg/mL	採取量(注9) m³N or g	分取液量 ／ 抽出液量 mL/mL	最終 定容量 mL	希釈 倍率	実測濃度(注10) μg/m³N or g
排ガス ばいじん 燃え殻	0.0038	2	10/20	0.9	20	0.068

(注 9) 排出ガス m³N、ばいじん及び燃え殻 g
(注 10)排出ガスμg/m³N、ばいじん及び燃え殻　μg/g

７．測定量(毒性等量)への換算

図4-4-16 に、生物検定法によって測定された濃度のHRGC/HRMS 法によって求めた濃度に対する相関図を示す。現時点で相関図より近似式を求めた結果、排出ガスの場合y=1.488x、ばいじんの場合y=1.221x 及び燃え殻の場合y=1.267x となっている。従って、生物検定法で求めた実測濃度(ng/m³N あるいはng/g)を、排出ガスの場合、換算係数1.488 (μg/ng-TEQ)、ばいじんの場合、換算係数1.221 (μg/ng-TEQ)、及び燃え殻の場合、換算係数1.267 (μg/ng-TEQ)を除して測定量(毒性等量)を求める。次式により測定量(毒性等量)を算出する。また、測定量(毒性等量)への換算係数の例を表4-4-13に示す。

$$\text{測定量}(\text{毒性等量})(\mathrm{ng-TEQ/m^3{}_N}\text{又は}\mathrm{ng-TEQ/g}) = \frac{C_S}{k}$$

ここに、 Cs ： (TCPHA 標準溶液相当) 実測濃度 (μg/m³N 又は μg/g)(注11)

k ：測定量(毒性等量)への換算係数(μg/ng-TEQ)

(注11) (TCPHA 標準溶液相当) 実測濃度の算出方法の詳細は5.3を参照すること。

表 4-4-13 毒性等量への換算係数の例

	排出ガス	ばいじん	燃え殻
換算係数	1.488	1.221	1.267

なお、測定結果の報告様式については、第2章第2節「測定結果の報告」を参照すること。

８．換算係数の確認

少なくとも 6 ヶ月に 1 回、HRGC/HRMS 法によって測定された試料について、本測定法による測定を行い、HRGC/HRMS 法により得られた測定量（毒性等量）と本測定法で得られた実測濃度より換算係数を算出し、換算係数と比較する。また、測定条件が大幅に変わった場合（機器、試薬又は施設等の変更若しくは測定担当者の変更等）にも、確認を行う。得られた換算係数が、第６節の換算係数と大きく換算係数が乖離する場合又は相関が悪い場合には、原因の究明を行い、その結果及び講じた措置を記録する。

試料は、片方について HRGC/HRMS 法に定められた方法により前処理を行い、残りについては生物検定法に定められた方法により前処理を行って試料を調製する。

排出ガス試料については、JIS K0311 に従い抽出までを行った抽出試料（ただし、アッセイに影響を及ぼすサンプリングスパイク及び抽出工程でのクリーンアップスパイクの添加は行わない）を分割し、片方は JIS K0311 に定められた方法により測定量（毒性等量）を求める。残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

ばいじん及び燃え殻試料については、平成 4 年厚生省告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法（ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない）により測定量（毒性等量）を求め、残りは、本法 4.1～4.3 及び 5.3 に従って操作した生物検定法における実測濃度と比較して、換算係数を算出する。

第６節 参考資料

「実測濃度から測定量（毒性等量）を求める際の換算係数の導出について（排出ガス試料）」

濃度既知の試料を本測定方法により測定し得られら実測濃度（μg/mL）と、HRGC/HRMS 法により測定し得られた試料中の毒性等量（ng-TEQ/mL）の関係から測定量（毒性等量）への換算式を算出した（図 4-4-16 参照）。

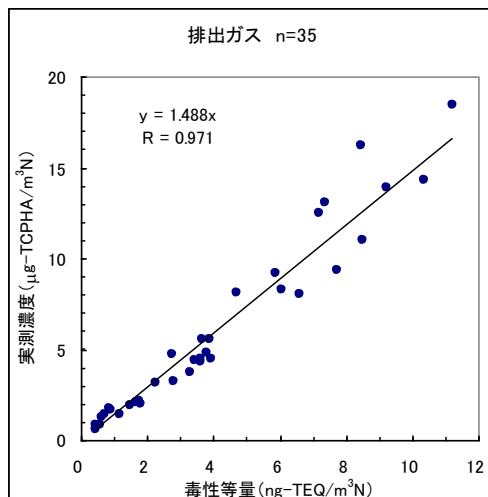



図 4-4-16 換算係数算出（例）（排出ガス）

「実測濃度から測定量（毒性等量）を求める際の換算係数の導出について（はいじん及び燃え殻試料）」

濃度既知の試料を本測定方法により測定し得られら実測濃度（μg/mL）と、HRGC/HRMS 法により測定し得られた試料中の毒性等量（ng-TEQ/mL）の関係から測定量（毒性等量）への換算式を算出した（図 4-4-17 参照）。

図 4-4-17 換算係数算出（例）（ばいじん及び燃え殻）